



Ana Rita Ladeira Courelas da Silva

Licenciada

Importância do Complexo Mediador na Actividade Transcricional do Yap8

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Regina Menezes, Doutora, ITQB/UNL
Co-orientadora: Claudina Rodrigues-Pousada, Professora Doutora, ITQB/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Sampaio
Arguente: Prof. Doutor Adriano Henriques
Vogal: Doutora Regina Menezes



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Setembro de 2011



Ana Rita Ladeira Courelas da Silva

Licenciada

Importância do Complexo Mediador na Actividade Transcricional do Yap8

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Regina Menezes, Doutora, ITQB/UNL
Co-orientadora: Claudina Rodrigues-Pousada, Professora Doutora, ITQB/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Sampaio
Arguente: Prof. Doutor Adriano Henriques
Vogal: Doutora Regina Menezes



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Setembro de 2011

Importância do Complexo Mediador na Actividade Transcricional do Yap8

Copyright Ana Rita Ladeira Courelas da Silva, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*O trabalho aqui descrito foi desenvolvido no
Laboratório Genomics and Stress, Instituto de
Tecnologia Química e Biológica, Universidade
Nova de Lisboa*

Agradecimentos

É com enorme satisfação que exponho aqui o meu sincero agradecimento a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar venho expressar os meus agradecimentos à Professora Doutora Claudina Rodrigues-Pousada, co-orientadora deste trabalho, por ter-me recebido no seu laboratório e por ter acreditado nas minhas capacidades.

Em segundo lugar, um profundo agradecimento à Doutora Regina Menezes pela excelência na orientação científica, leccionação, apoio e disponibilidade em todos os momentos.

Aos meus Pais, pelo apoio incondicional.

Ao André por toda a compreensão e amor.

À Soraia, por todas as dicas úteis e amizade.

Aos meus colegas do laboratório *Genomics and Stress* pelo excelente convívio, o que me proporcionou uma enorme satisfação em desenvolver este trabalho neste laboratório.

Aos meus amigos Daniel e Carina, pelos cafés e conversas que tanto me ajudaram a aliviar o cansaço.

Sumário

Os processos adaptativos às mudanças ambientais ocorrem principalmente através da reprogramação da expressão genética. A activação de genes de stress é controlada por factores de transcrição específicos que facilitam o recrutamento do complexo de pré-iniciação da transcrição para as regiões promotoras. O complexo Mediador é um co-activador necessário para a activação de vários genes, tanto em leveduras como em mamíferos. O domínio da cauda deste complexo interage com alguns factores de transcrição específicos, transmitindo o sinal de activação para a maquinaria basal de transcrição, enquanto o domínio CDK8 é responsável pela regulação do complexo, podendo exercer uma função activadora ou repressora. Em *Saccharomyces cerevisiae*, o factor de transcrição Yap8 desempenha um papel primordial na resposta ao stress induzido pelo arsénio. Na presença de arsénio, o Yap8 é acumulado no núcleo regulando a activação transcripcional dos genes *ACR2* e *ACR3*, que codificam para uma redutase de arsenato e uma proteína da membrana, respectivamente. Neste trabalho investigaram-se os mecanismos através dos quais o Yap8 induz a activação transcripcional do gene *ACR2* e avaliou-se a importância do complexo Mediador neste processo. Os resultados obtidos indicam que as subunidades Med2, Med3, Med14, Med15 e Med16 da cauda do complexo Mediador são importantes para a sobrevivência da levedura ao stress imposto pelo arsénio. Na ausência destas subunidades, a capacidade do Yap8 em activar a transcrição dos genes *lacZ* e *ACR2* é drasticamente reduzida. Foi também demonstrado que o Yap8 estabelece interacções físicas com a subunidade Med2 e desta forma transmite o sinal de activação para maquinaria basal de transcrição. Além disso, os resultados mostram que o módulo CDK8 exerce a função de regulador negativo da actividade de trans-activação do Yap8, destabilizando quer o Yap8 quer o Med2.

Palavras-chave: *S. cerevisiae*, arsénio, Yap8, Mediador, transcrição.

Abstract

The adaption to environmental changes is mainly promoted through reprogramming of gene expression. This process is tightly orchestrated by specific transcription factors, which sense the stress signal and mediate the recruitment of the pre-initiation complex to the promoter of its target genes. The Mediator complex is also required for full activation of many genes in yeast and mammals. The tail domain of this complex interacts with some transcription factors and transduces the activation signal to the basal transcription machinery. The CDK8 domain regulates the activity of the Mediator complex, exerting either a positive or negative regulatory role. In *Saccharomyces cerevisiae*, the Yap8 regulatory protein plays a pivotal role in arsenic stress responses. It is accumulated in the nucleus upon arsenic insult and regulates transcriptional activation of *ACR2* and *ACR3*, which encodes the arsenate-reductase and the plasma membrane arsenite-efflux protein, respectively. This work aimed to study the mechanisms by which Yap8 induces the transcriptional activation of *ACR2* and to evaluate the importance of the Mediator complex in this process. The results indicate that the subunits Med2, Med3, Med14, Med15 and Med16 of the Mediator tail domain are important for the adaptation of yeast cells to arsenic stress. In the mutants for the respective subunits, Yap8 failed to activate transcription of the *lacZ* reporter gene and *ACR2*. Furthermore, it was shown that Yap8 physically interacts with Mediator through the Med2 subunit which thus transmits the activation signal to the basal transcription machinery. The CDK8 module serves as a negative regulator of Yap8 trans-activation activity, since it destabilizes both Yap8 and Med2.

Key-words: *S. cerevisiae*, arsenic, Yap8, Mediator, transcription.

Índice Geral

1. Introdução.....	1
1.1 O arsénio no ambiente e na saúde	1
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo biológico	2
1.3 Resposta ao stress na levedura e a família dos factores de transcrição Yap	2
1.4 Yap1 e Yap8 na destoxificação dos compostos de arsénio	5
1.5 O complexo Mediador	7
1.6 Objectivos	12
2. Materiais e Métodos	13
2.1 Estirpes e condições de crescimento	13
2.2 Plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho.....	14
2.3 Preparação e transformação de células competentes de levedura	17
2.4 Análises fenotípicas.....	17
2.5 Ensaio de trans-activação em meio sólido	18
2.6 Ensaio de trans-activação em meio líquido.....	18
2.7 Ensaio de <i>Two-hybrid</i>	18
2.8 <i>Northern-blot</i>	19
2.9 <i>Western-blot</i>	20
2.10 Co-imunoprecipitação	21
3. Resultados e Discussão	23
3.1 O complexo Mediador é necessário para a resposta da levedura ao stress induzido pelos compostos de arsénio	23
3.2 Mutações na cauda do complexo Mediador comprometem a actividade do Yap8 mas não interferem nos seus níveis de mRNA e proteína	25
3.3 Mutações na cauda do complexo Mediador comprometem a actividade de trans-activação do Yap8.....	27
3.4 A subunidade Med2 do complexo Mediador interage fisicamente com o Yap8.....	29

3.5 O módulo CDK8 é necessário para a activação de genes envolvidos na sobrevivência da célula ao stress pelos compostos de arsénio	33
3.6 O módulo CDK8 do complexo Mediador regula negativamente a actividade de trans-activação do Yap8	35
3.7 A cinase Cdk8 actua como repressor da actividade de trans-activação do Yap8 devido à destabilização dos níveis de Yap8 e Med2.....	36
4. Conclusões e Considerações Finais	39
5. Referências Bibliográficas	41

Índice de Figuras

Figura 1.1 Representação da estrutura do domínio de ligação ao DNA do factor de transcrição Gcn4	4
Figura 1.2 Representação esquemática dos domínios funcionais dos membros da família Yap	5
Figura 1.3 Representação esquemática dos transportadores envolvidos na internalização e destoxificação do arsénio na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Figura 1.4 Representação esquemática da estrutura e organização das subunidades que compõem o complexo Mediador	9
Figura 1.5 Representação esquemática da estrutura do Mediador nas diversas etapas da iniciação da transcrição	10
Figura 1.6 Comparação entre a estrutura do complexo Mediador de <i>S. cerevisiae</i> e humano	11
Figura 3.1 A subunidade da cauda do Mediador é necessária para a resposta da levedura ao stress por arsénio	24
Figura 3.2 A expressão do gene <i>ACR2</i> é afectada por mutações na cauda do Mediador enquanto a expressão do <i>YAP8</i> permanece inalterada.	26
Figura 3.3 Representação esquemática do ensaio de trans-activação em levedura	28
Figura 3.4 A disrupção das subunidades na cauda do Mediador afecta a actividade de trans-activação do Yap8.	29
Figura 3.5 Ensaio de <i>two-hybrid</i> em levedura	30
Figura 3.6 O Yap8 interage com a subunidade Med2 do Mediador no sistema <i>Two-hybrid</i>	31
Figura 3.7 Representação esquemática do procedimento de co-imunoprecipitação	32
Figura 3.8 O Yap8 interage com o módulo da cauda do Mediador através da subunidade Med2	33
Figura 3.9 O módulo CDK8 é especificamente necessário para a adaptação da célula ao stress induzido pelos compostos de arsénio.	34
Figura 3.10 A disrupção das subunidades do módulo CDK8 do Mediador afecta a actividade de trans-activação do Yap8.	36
Figura 3.11 A cinase Cdk8 regula negativamente os níveis de Med2 e Yap8... ..	37
Figura 4.1 Modelo de interacção do Yap8 com o Mediador e sua regulação	40

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 Estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas neste estudo.....	13
Tabela 2.2 Oligonucleótidos utilizados neste trabalho	15
Tabela 2.3 Plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho	16

Listagem de Abreviaturas e Siglas

As(V) – arsenato

As(III) – arsenito

HSF – *Heat shock factors*

HSP – *Heat shock proteins*

STRE – *Stress responsive element*

PKA – proteína cinase A

YRE – *Yeast responsive elements*

YAP – *yeast AP-1 like proteins*

ACR – *Arsenic compounds resistance*

NES – *Nuclear export signal*

Cys – Cisteína

YCF1 – *Yeast cadmium factor 1*

GSH – glutationo reduzido

ROS – espécies reativas de oxigénio

TBP – *TATA-Binding protein*

RNA Pol II – RNA polimerase II

Med – Mediador

CTD – Domínio C-terminal

YPD – *Yeast peptone dextrose*

MSC – Meio sintético completo

SD – *drop-out*

CAA – casaminoácidos

YNB – *Yeast nitrogen base*

LB – Luria Bertani

dNTPs – desoxirribonucleótidos

Ura – Uracilo

Leu – Leucina

Trp – Triptofano

UV – ultra-violeta

TCA – Ácido tricloroacético

EDTA – Ácido etilenodiamina tetra-acético

PVDF - *polyvinylidene fluoride*

L- litro

mL – mililitro

h – horas

°C – graus Celsius

DO₆₀₀ – densidade óptica a 600 nanómetros

µL – microlitro

min – minuto

mg – miligrama

ng – nanograma

µg – micrograma

nm – nanómetros

mM – milimolar

M – molar

V – volts

WT – *Wild type* (estirpe selvagem)

Yap – Proteína

YAP – Gene

yap – Mutante

1. Introdução

1.1 O Arsénio no ambiente e na saúde

O arsénio é um metalóide tóxico e um potente carcinogénio humano largamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado em rochas, no solo, no ar e na água. De facto, a presença de compostos de arsénio nos lençóis freáticos que são utilizados como água potável em diversos países tais como Bangladesh, Chile e China (Järup, 2003), representa um grave problema de saúde pública. Também em Portugal existem localidades onde a água é contaminada com arsénio, sendo a área mais crítica o concelho de Ponte de Sôr (IRAR/ERSAR).

O arsénio pode ser encontrado na natureza sob quatro estados oxidativos: As(V) (arsenato), As(III) (arsenito), As(0) (arsénio orgânico) e As(-III) (arsenido). As formas inorgânicas, arsenato e arsenito, são libertadas para o ambiente através de fenómenos naturais como as erupções vulcânicas, e também devido a causas antropogénicas, destacando-se as actividades de extracção de minerais, fundição do cobre, queima do carvão e outros processos de combustão. O arsénio inorgânico também é utilizado como composto activo de diversos insecticidas, herbicidas e rodenticidas.

Os microrganismos possuem um papel importante na acumulação de arsénio no ambiente sendo o arsenito produzido e libertado por microrganismos que utilizam o arsenato como aceitador final de electrões na respiração anaeróbia. Por outro lado, os microrganismos capazes de oxidar o arsenito utilizam o seu poder redutor na obtenção de energia para o crescimento celular, enquanto outros conseguem converter o arsénio inorgânico em gás de arsenido metilado ou em espécies de arsénio orgânico solúveis em lípidos e na água, que incluem derivados do arsénio di e tri-metilado (Bhattacharjee e Rosen, 2007).

A exposição crónica aos compostos de arsénio está associada a inúmeras doenças que incluem o cancro de fígado, rins, pulmão, pele, bexiga, ovários e próstata (Vahter, 2009; Evens *et al*, 2004). Embora seja classificado como um agente carcinogénico do grupo A pela Agência de Protecção do Ambiente (*Environmental Protection Agency*, EPA), a exposição crónica ao arsénio também ocasiona outras doenças como hiperqueratose, *diabetes mellitus*, doenças cardiovasculares, neurológicas e respiratórias (Vahter, 2009).

Apesar da sua conhecida toxicidade, diversos fármacos que contêm arsénio como princípio activo fazem parte da terapia moderna. O trióxido de arsénio é utilizado no tratamento da leucemia promielocítica aguda, uma vez que é capaz de induzir a maturação e apoptose dessas células cancerígenas, inibir a proliferação das células tumorais e a angiogénese, e reduzir a densidade microvascular da medula óssea associada à doença (Momeny *et al*, 2010; Ghavamzadeh *et al*, 2006; Evens *et al*, 2004; Waxman e Anderson, 2001). Além do mais, a utilização do trióxido de arsénio tem-se revelado eficaz no tratamento de cancros hematológicos e sólidos (Evens *et al*, 2004) e de doenças

causadas por protozoários como *Trypanosoma* spp e *Leishmania* spp (Thorsen *et al*, 2006; Murray, 2004; Barrett *et al*, 2003).

Para uma utilização eficaz destes compostos na terapia médica, torna-se imperativo uma caracterização exaustiva das vias celulares de absorção, o estudo das proteínas reguladoras que modulam a actividade dessas vias, tal como os sistemas que medeiam a destoxificação e tolerância ao nível molecular.

1.2 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem provado ao longo dos anos ser um excelente organismo modelo para o estudo de uma grande variedade de funções celulares básicas que são conservadas em células de eucariotas superiores.

São diversas as características que fazem da levedura um organismo adequado para o estudos genéticos, bioquímicos e celulares. As leveduras podem ser cultivadas em meios de crescimento relativamente baratos e possuem um tempo de duplicação curto (Sherman, 2002) comparativamente com as células eucarióticas superiores, aspectos estes que permitem o isolamento de uma grande quantidade de material biológico para estudos moleculares e bioquímicos (Altmann *et al*, 2007). O facto de ser de fácil manipulação genética e do seu genoma ter sido tornado público em 1996, tendo cerca de 6000 genes codificantes para proteínas, muitos apresentando ortólogos em eucariotas superiores, torna a levedura torna um modelo ideal para a caracterização funcional destes genes (Goffeau *et al*, 1996; Dujon *et al*, 1994). Uma das aplicações mais recentes é a sua utilização como modelo experimental para o estudo das doenças neurodegenerativas. De facto, em 2003 foi demonstrado que leveduras expressando o gene que codifica para a α -sinucleína podem servir como "tubos de ensaio vivos". Esta proteína compromete a função do cérebro humano em pessoas com doença de Parkinson e, nas leveduras, uma cópia deste gene não altera o crescimento celular enquanto que duas cópias tornam-se letais (Outeiro e Lindquist, 2003). Outras aplicações mais recentes estão relacionadas com o estudo dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagénicos de diversos compostos, como o *difenil ditelluride* (DPDT) (Degrandi *et al*, 2010), ou com a identificação dos compostos tóxicos e genotóxicos em sedimentos marinhos (Frassinetti *et al*, 2011).

1.3 Resposta ao stress na levedura e a família dos factores de transcrição Yap

A capacidade de adaptação dos organismos às alterações das condições intra- e extra-celulares é um pré-requisito para a sua sobrevivência e evolução. A existência de mecanismos moleculares responsáveis pela resposta, reparação e adaptação a estas condições tornam as células suficientemente

plásticas para se ajustarem ao meio ambiente em constante alteração, evento homeostático este também designado por resposta ao stress (Rodrigues-Pousada *et al*, 2010).

Quando exposta a uma panóplia de agressões ambientais, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* desencadeia uma complexa reprogramação da expressão genética que envolve a diminuição da expressão de genes *housekeeping* e da síntese proteica e o aumento da expressão de genes que codificam para proteínas de stress. Entre as proteínas de stress estão incluídas as chaperonas moleculares, responsáveis pela manutenção da conformação das proteínas, de certos factores de transcrição que modulam a expressão genética, dos transportadores de membrana, das proteínas envolvidas na reparação do DNA e das vias de destoxificação de elementos tóxicos para as células (Rodrigues-Pousada *et al*, 2010).

Entre os vários factores de transcrição envolvidos na resposta geral ao stress estão os HSFs (*Heat Shock Factors*) que se ligam ao elemento *cis* HSE (*Heat Shock Element*) 5'nGAAn3' e modulam a expressão das Hsps (*Heat Shock Proteins*), particularmente necessárias na manutenção da estrutura de proteínas danificadas por condições de stress como choque térmico, stress oxidativo, privação de azoto, transição para a fase estacionária e exposição a diamida. Os factores Msn2 e Msn4 reconhecem a sequência 5'CCCCT3', denominada elemento de resposta ao stress (STRE), e são regulados negativamente pelos níveis de cAMP e pela actividade da proteína cinase A (PKA) (Rodrigues-Pousada *et al*, 2010; Martinez-Pastor *et al*, 1996; Hightower, 1991).

No entanto, condições de stress específicas originam respostas celulares diferentes, isto é, a reprogramação genética necessária para garantir a sobrevivência a uma determinada condição de stress depende dos factores de transcrição específicos que são estimulados e do conjunto de genes que estes regulam. Os factores de transcrição da família Yap (*Yeast AP1-like Protein*) actuam como reguladores da transcrição de genes relacionados com a resposta a várias condições de stress em *S. cerevisiae*. Esta família é constituída por oito membros, do Yap1 ao Yap8, cujos domínios de ligação ao DNA apresentam semelhança com o domínio de ligação ao DNA do Gcn4, a proteína AP-1 convencional de *S. cerevisiae* (figura 1.1). O domínio de ligação ao DNA dos membros desta família, designado por b-ZIP *DNA-binding-domain*, é composto por uma região conservada (região básica), responsável pela interacção com o DNA que antecede um motivo proteico denominado “fecho com leucinas” (figura 1.2). Este motivo é essencial para a dimerização destes factores de transcrição, estrutura em que são activos (Rodrigues-Pousada *et al*, 2010).

Embora exista uma grande semelhança na estrutura primária do domínio de ligação ao DNA entre os membros da família Yap e o Gcn4, alguns resíduos específicos conferem diferentes propriedades de ligação ao DNA (figura 1.2). De uma maneira geral, os membros da família Yap reconhecem sequências genómicas designadas por YRE (*Yeast Responsive Elements*). Os membros Yap1-Yap6 reconhecem a sequência canónica TTAC/GTAA enquanto o Yap8 reconhece a sequência

TGATTAATAATCA. O local de ligação do Yap7 ainda não foi caracterizado (Amaral *et al*, resultados não publicados; Rodrigues-Pousada *et al*, 2010; Ilina *et al*, 2008).

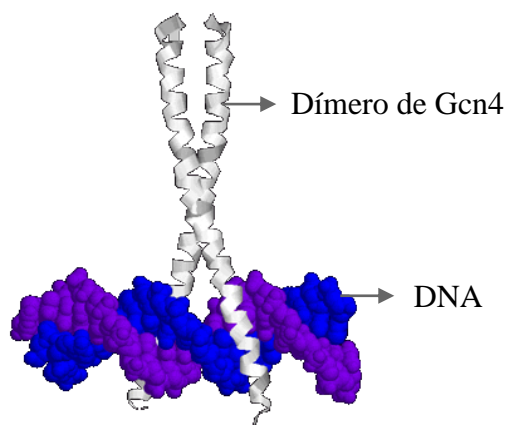


Figura 1.1: Representação da estrutura do domínio de ligação ao DNA do factor de transcrição Gcn4 (adaptado de <http://higheredbcs.wiley.com>).

Em *S. cerevisiae*, o Yap1 é o principal regulador envolvido na resposta ao stress oxidativo e ao stress imposto por vários metais, enquanto o Yap2 está principalmente relacionado com a resposta ao stress induzido pelo cádmio. O Yap4 e o Yap6 são reguladores importantes no stress osmótico e nutricional, o Yap5 está envolvido no metabolismo do ferro, o Yap3 participa nos mecanismos de tolerância aos metabolitos fenólicos do benzeno e o Yap8 desempenha um papel fundamental na destoxificação dos compostos de arsénio (North *et al*, 2011; Rodrigues-Pousada *et al*, 2010). Ao Yap7 ainda não foram atribuídas funções específicas. Apesar destes factores de transcrição possuírem funções específicas, parece haver um certo grau de sobreposição funcional entre eles. O Yap1 regula a activação transcricional do *YAP4* enquanto o Yap4 parece ser capaz de formar heterodímeros com o Yap6 (Rodrigues-Pousada *et al*, 2010). No stress imposto pelos compostos de arsénio, o Yap1 é capaz de se ligar às sequências de reconhecimento do Yap8 e activar a expressão dos seus genes alvo (Rodrigues-Pousada *et al*, 2010). Estes aspectos demonstram que a regulação da expressão genética em condições de stress implica a cooperação entre vários reguladores transcripcionais.

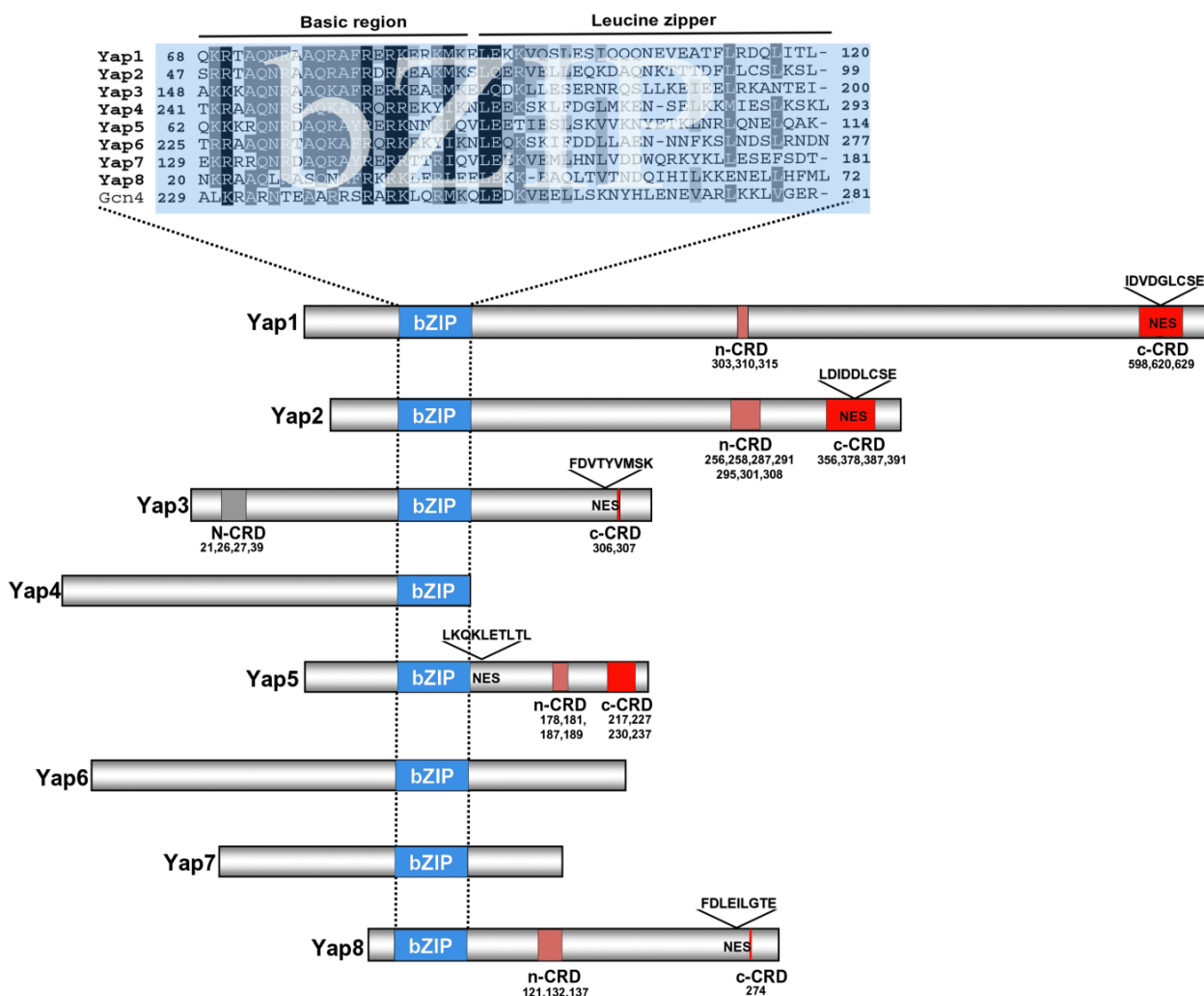


Figura 1.2: Representação esquemática dos domínios funcionais dos membros da família Yap (Rodrigues-Pousada *et al*, 2010).

1.4 Yap1 e Yap8 na destoxificação dos compostos de arsénio

Quando a levedura *S. cerevisiae* é exposta a ambientes contaminados com arsénio, vários mecanismos celulares para a sua destoxificação são activados. O principal mecanismo é composto por proteínas codificadas pelos genes pertencentes ao *cluster ACR* (*Arsenic Compounds Resistance*). O gene *ACR1/YAP8* codifica para o Yap8, que é constitutivamente expresso e maioritariamente localizado no citoplasma da célula em condições fisiológicas. Após a indução pelos compostos de arsénio, o Yap8 é activado, possivelmente devido à alquilação dos resíduos de cisteína Cys¹³², Cys¹³⁷ e Cys²⁷⁴, e retido no núcleo. Esta retenção deve-se à importação constitutiva para o núcleo através da importina PseI e interrupção da sua exportação para o citoplasma devido à disrupção da interacção entre o NES (*Nuclear Export Signal*) e a exportina Crm1, causada pela modificação das cisteínas do Yap8 pelo arsénio. Uma vez acumulado no núcleo, o Yap8 activa os genes *ACR2* e *ACR3* que

codificam para uma redutase de arsenato e uma bomba de efluxo de arsenito, respectivamente (Menezes *et al*, 2004).

Outro membro da família Yap, o Yap1, também contribui para adaptação celular aos compostos de arsénio. Além de cooperar com o Yap8 na activação dos genes *ACR2* e *ACR3*, o Yap1 é o principal regulador da activação transcricional do gene *YCF1* (*Yeast Cadmium Factor 1*), o qual codifica para uma ATPase que facilita o sequestro de arsenito conjugado com glutatióno para o vacúolo (Bhattacharjee e Rosen, 2007; Menezes *et al*, 2004). O Yap1 também executa um papel importante na manutenção do equilíbrio redox alterado pelos compostos de arsénio, através da activação de genes antioxidantes como *TRX2*, *GSH1* e *SOD1*, que codificam respectivamente para a tiorredoxina, γ -glutamylcisteínasintetase e superóxido dismutase (Menezes *et al*, 2008).

Tanto o arsenato como o arsenito entram na célula de uma maneira fortuita utilizando sistemas de importe celulares. Devido à sua semelhança estrutural com o fostato, o arsenato é internalizado através dos transportadores de fosfatos Pho84, Pho86, Pho87, Pho88 e Pho90 (Ghillebert *et al*, 2011; Rosen, 2002; Bun-ya *et al*, 1996). Por outro lado, a associação de várias moléculas de arsénio no seu estado trivalente ($\text{As}(\text{OH})_3$) mimetiza um anel de seis membros tal como o anel das hexoses, sendo por este motivo transportado pelos transportadores de hexoses Hxts (Bhattacharjee e Rosen, 2007). Entretanto, na presença de glucose a entrada de arsenito na célula é maioritariamente catalisada pela aquagliceroporina Fps1 (Bhattacharjee e Rosen, 2007; Thorsen *et al*, 2006; Rosen, 2002).

Uma vez no citoplasma da célula, o arsenato é reduzido a arsenito pela enzima redutase de arsenato sendo este eliminado para o meio extracelular através da bomba de efluxo Acr3 ou sequestrado no vacúolo após a conjugação com o glutatióno, através da proteína Ycf1 com dispêndio de ATP (figura 1.3) (Menezes *et al*, 2008).

Os efeitos tóxicos do arsénio na levedura são sentidos a diversos níveis. O arsénio no estado trivalente é mais tóxico que o pentavalente devido ao facto de este possuir quatro pares de electrões não partilhados que podem interagir com várias moléculas biológicas (Kitchin e Ahmad, 2003). O arsenito acumulado no citoplasma é capaz de interagir com os grupos tiol das proteínas provocando a inibição de várias vias metabólicas. Por exemplo, foi demonstrado que o arsenito modifica os resíduos de cisteína da tubulina interferindo com a sua organização e com a montagem dos microtúbulos (Zhou *et al*, 2009). Sendo um análogo do fosfato, o arsenato, interfere com as reacções de fosforilação que são necessárias para a activação de proteínas e vias metabólicas.

A depleção do GSH, ocasionada pela redução do arsenato e conjugação com As(III), juntamente com a inibição da tiorredoxina-redutase leva à acumulação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) no citoplasma e a perturbação do equilíbrio redox. As ROS reagem com os centros de ferro-enxofre das proteínas como descrito pelas reacções de Fenton e de Haber-Weiss ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}^\cdot + \text{HO}^- + \text{Fe}^{3+}$; $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$), produzindo novas espécies reactivas que por sua vez provocam lipoperoxidação e danos ao nível do DNA e proteínas (Menezes *et al*, 2008; Dickman, 2007; Toledano

et al, 2003). Além disto, ambas as formas inorgânicas de arsénio são capazes de libertar iões ferro acumulados na ferritina (Kitchin e Ahmad, 2003) resultando numa desregulação do metabolismo do ferro.

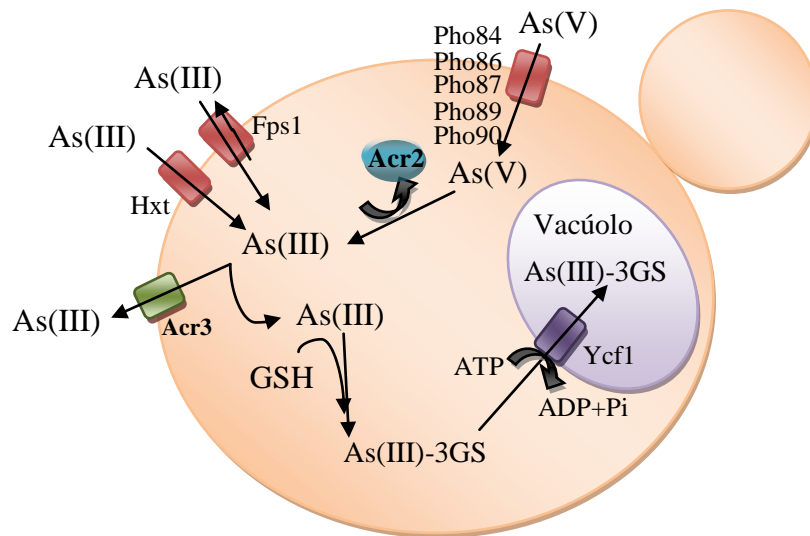


Figura 1.3: Representação esquemática dos transportadores envolvidos na internalização e destoxificação do arsénio na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de Menezes *et al*, 2008).

1.5 O complexo Mediador

A transcrição de genes eucariotas que codificam para proteínas é um processo que envolve muitos factores transcricionais que actuam em diversos níveis, sendo a iniciação da síntese de RNA mensageiro o passo mais importante da regulação da expressão genética. Este processo é catalisado pela RNA polimerase (Pol) II e controlado pela maquinaria basal de transcrição que envolve os factores de transcrição gerais TBP (TATA-binding protein), TFIIA, -B, -D, -E, -F e -H, necessários para a eficiente iniciação da transcrição (Casamassimi e Napoli *et al*, 2007; Lodish *et al*, 2000). Além destes factores de transcrição gerais, a actividade dos complexos remodeladores e modificadores da cromatina como o SAGA e o Swi/Snf é também fundamental para a correcta iniciação da transcrição. O SAGA é um complexo proteico que contém a proteína Gcn5, a qual tem como função a acetilação preferencial da histona H3 dos nucleossomas, levando ao relaxamento do empacotamento dos cromossomas. Esta acetilação das histonas promove locais de ligação para as proteínas remodeladoras da cromatina do complexo Swi/Snf, como as Swi2/Snf2. Por sua vez, o complexo SAGA também pode actuar independentemente da sua função de histona acetiltransferase em alguns promotores. Este é capaz de interagir directamente com a TBP através das suas subunidades Spt3 e Spt8, promovendo o início da transcrição (Leroy *et al*, 2006).

A identificação do complexo Mediador em *S. cerevisiae* foi efectuada na década de 90 utilizando-se técnicas de genética e bioquímica (Kelleher *et al*, 1990). Este complexo desempenha a função de

“Mediador” entre os factores de transcrição específicos, como activadores ou repressores, e a maquinaria basal de transcrição, contendo a RNA polimerase II e os factores de transcrição gerais (Kornberg, 2006; Biddick e Young, 2005). A principal função do Mediador está associada ao aumento da eficiência na formação do complexo de pré-iniciação bem como ao recrutamento da RNA polimerase II, TFIID e outros factores de transcrição gerais para a região promotora dos genes sob o seu controlo, através da interacção directa com estes elementos (Casamassimi e Napoli, 2007).

O Mediador é um complexo proteico constituído por quatro módulos designados por cauda, cabeça, domínio intermédio e domínio Cdk8 (figura 1.4), cada um desempenhando funções específicas (Casamassimi e Napoli, 2007). A cauda do Mediador inclui as proteínas Med2, Med3, Med5, Med14, Med15 e Med16 e interage com os activadores e repressores transcripcionais (Herbig *et al*, 2010). O módulo intermédio, que contém as subunidades Med1, Med4, Med7, Med9, Med10, Med21 e Med31, transfere o sinal regulatório da cauda para a cabeça do Mediador após a sua ligação com os factores de transcrição específicos (Lewis e Reinberg, 2003). Por sua vez, o módulo da cabeça é o que contacta e transfere o sinal de indução para a RNA polimerase II (Soutourina *et al*, 2011; Davis *et al*, 2002) e para a TBP, sendo constituído pelas proteínas Med6, Med8, Med11, Med17, Med18, Med19, Med20 e Med22 (Casamassimi e Napoli, 2007). O domínio regulatório do complexo é composto pelas subunidades Med12, Med13, uma cinase dependente de ciclina Cdk8 e uma ciclina designada por CycC (Bourbon, 2008). Quando o domínio regulatório não está associado aos outros módulos do Mediador este é designado por C(“core”)-Mediador enquanto os complexos que contêm os quatro módulos é designado por L-Mediador (Casamassimi e Napoli, 2007).

A actividade do complexo Mediador é importante não só para a activação transcripcional de genes sob condições ambientais específicas (Bjorklund e Gustafsson, 2005; Kornberg, 2005; Fan *et al*, 2006), mas também para a expressão basal de muitos genes *in vitro* (Thompson e Young, 1995; Holstege *et al*, 1998) e *in vivo* (Andrau *et al*, 2006). Na sua forma inactiva, o complexo Mediador encontra-se sob uma conformação fechada, com as subunidades do domínio intermédio e cabeça interagindo entre si. Após a ligação de determinados elementos regulatórios, como os factores de transcrição específicos, o Mediador sofre uma mudança na sua estrutura, adoptando uma conformação aberta e criando uma superfície de contacto para recrutar os factores de transcrição gerais e a RNA polimerase II (Chadick e Asturias, 2005) (figura 1.5). A forma desfosforilada do domínio C-terminal (CTD) da RNA polimerase II está associada à formação do complexo de pré-iniciação enquanto que a sua fosforilação leva ao início da elongação da transcrição (Björklund e Gustafsson, 2005). Foi demonstrado que o Mediador, através do seu domínio regulatório CDK8 fosforila o CTD da RNA polimerase II (Sogaard e Svejstrup, 2007; Liu *et al*, 2004) levando à abertura do complexo de pré-iniciação e dissociação da RNA polimerase II do Mediador (Casamassimi e Napoli, 2007). Entretanto, o Mediador e alguns componentes do complexo de pré-iniciação incluindo a TBP, TFIIE e TFIIH permanecem ligados à região promotora de alguns genes após a libertação da RNA polimerase II, que

vai dar início à elongação, para facilitar a formação *de novo* do complexo de pré-iniciação (figura 1.5) (Chadick e Asturias, 2005).

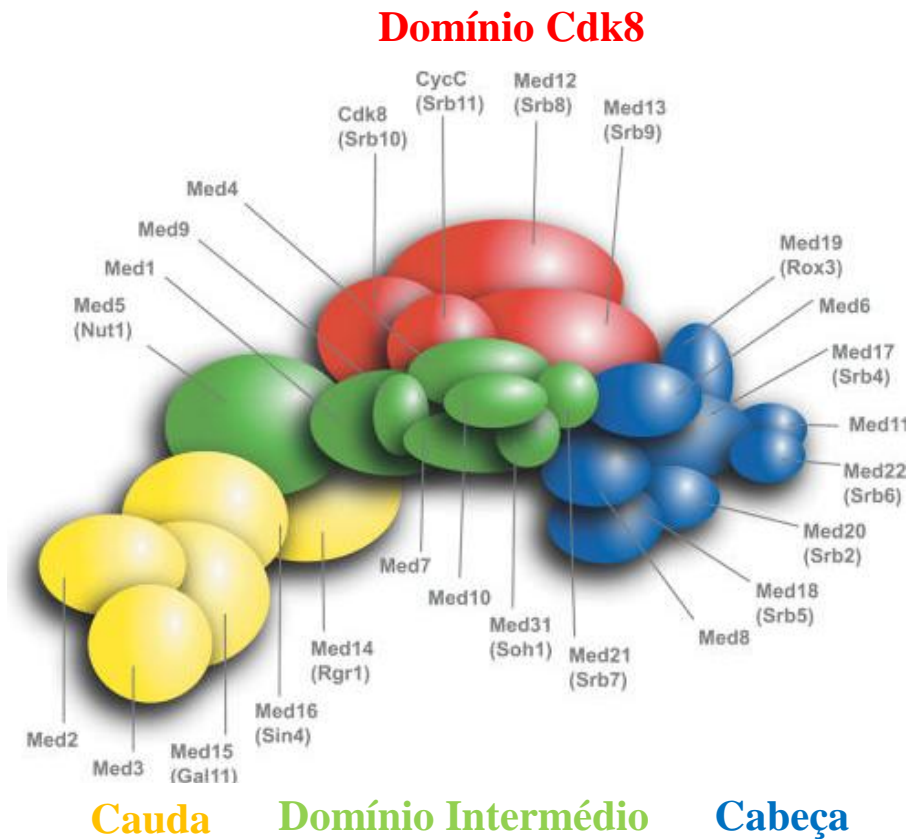


Figura 1.4: Representação esquemática da estrutura e organização das subunidades que compõem o complexo Mediador (adaptado de Gluglielmi *et al*, 2004).

As primeiras evidências relacionadas com a actividade do complexo Mediador indicavam que o C-Mediador actuava como regulador positivo da transcrição, enquanto o L-Mediador possuía uma actividade repressora devido à fosforilação de proteínas específicas pela Cdk8. Corroborando esta ideia, foi descrito que a fosforilação do Gcn4 pela Cdk8 serve como um sinal para a sua degradação pelo proteossoma enquanto a fosforilação do Msn2 impede a sua acumulação nuclear (Chi *et al*, 2001). Além disso, também foi descrito que o módulo CDK8 é capaz de se ligar ao domínio intermédio e à cabeça do Mediador bloqueando estericamente a sua interacção com a RNA polimerase II (Elmund *et al*, 2006). No entanto, algumas evidências sugerem que o módulo CDK8 também pode exercer actividades de regulação positiva. Por exemplo, a subunidade Med12 é necessária para a activação da transcrição do gene *PDR5* induzida pela perda do genoma mitocondrial (Shahi *et al*, 2010) e a activação de genes controlados pelo factor de transcrição Sip4 é dependente da cinase Cdk8 em condições de privação de glucose (Vincent *et al*, 2001). Em conjunto estes resultados são

consistentes com a ideia de que o módulo CDK8 influencia a regulação da transcrição de uma maneira que é dependente do contexto do promotor e dos factores de transcrição específicos, sendo capaz de inibir ou estimular a expressão genética.

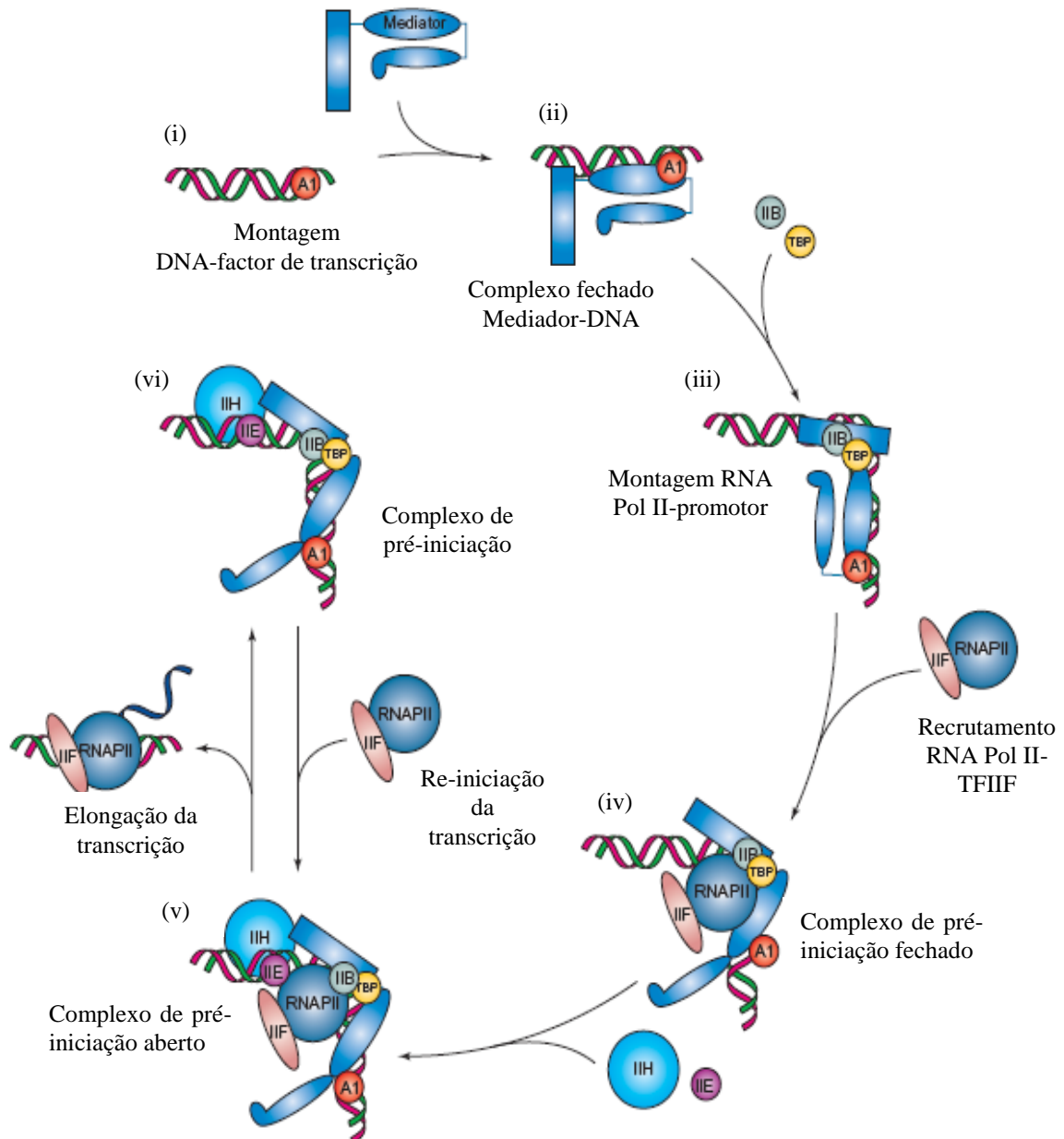


Figura 1.5: Representação esquemática da estrutura do Mediador nas diversas etapas da iniciação da transcrição (adaptado de Chadick e Asturias, 2005).

A estrutura do complexo Mediador das leveduras exibe extensa similaridade com o Mediador de humanos (figura 1.6) (Cai *et al*, 2009). Todas as subunidades do Mediador humano possuem ortólogos em *S. cerevisiae*, à excepção das subunidades Med2, Med3 e Med5 (Conaway *et al*, 2005) e, tal como na levedura, a RNA polimerase II parece interagir com o domínio intermédio e a cabeça do Mediador,

sendo ambos sujeitos a alterações conformacionais similares para que este contacto possa ocorrer (Cai *et al*, 2009). A similaridade estrutural e molecular do complexo Mediador em leveduras e humanos reflecte-se também em semelhança funcional. O Mediador humano encontra-se organizado sob os mesmos módulos, tendo a cauda, a cabeça e a zona intermédia as mesmas funções que o Mediador em *S. cerevisiae* (Casamassimi e Napoli, 2007). À semelhança do módulo CDK8 da levedura, também o módulo CDK8 do Mediador de humanos parece executar funções de regulador positivo ou negativo. A cinase Cdk8 de humanos é capaz de fosforilar e inibir o TFIIF (Akoulitchiev *et al*, 2000) e bloquear as interações entre o Mediador e a RNA polimerase II (Knuesel *et al*, 2008), ou de promover a activação da transcrição do receptor da hormona tiróide (Belakavadi e Fondell, 2010). Foi demonstrado que, quando hiper-activa, a cinase Cdk8 induz a sobre-expressão de β -catenina, sendo assim capaz de transformar células do cólon normais em cancerígenas (Firestein *et al*, 2008). Por esta razão, o gene CDK8 pode ser considerado um proto-oncogene.

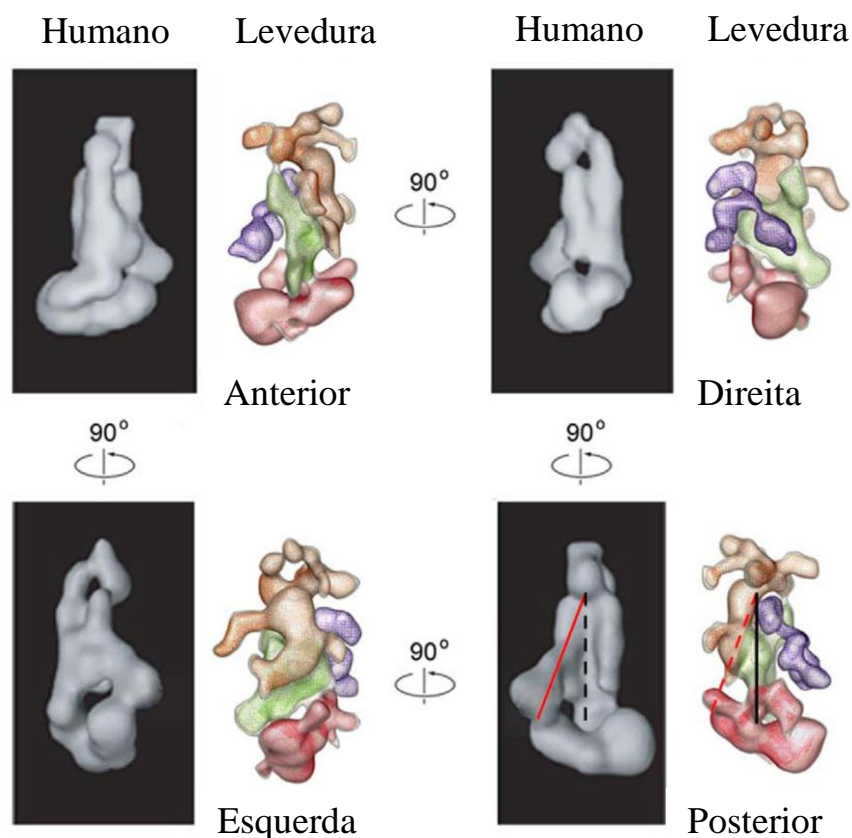


Figura 1.6: Comparação entre a estrutura do complexo Mediador de *S. cerevisiae* obtida por computador através da reconstrução de imagens de *cryo-EM* e estrutura do Mediador humano obtida por *cryo-EM* (adaptado de Cai *et al*, 2009).

1.6 Objectivos

Apesar de se conhecer o mecanismo pelo qual a célula combate o arsénio e qual a contribuição do Yap8 para este efeito, continua por se desvendar o mecanismo pelo qual o Yap8 induz o recrutamento da maquinaria basal de transcrição de forma a activar a transcrição dos genes *ACR2* e *ACR3* em resposta ao stress por arsénio. Neste contexto, o presente trabalho teve como objectivo geral a caracterização do papel do complexo Mediador na activação do gene *ACR2*.

Assim, pretendeu-se:

- 1) Determinar a contribuição das subunidades da cauda do Mediador para a adaptação celular ao stress imposto pelos compostos de arsénio;
- 2) Avaliar a importância do Mediador para a transcrição do *YAP8* e do seu gene alvo *ACR2*;
- 3) Avaliar a importância do Mediador para a actividade de trans-activação do Yap8;
- 4) Estabelecer as possíveis interacções físicas entre o Yap8 e as subunidades da cauda do Mediador;
- 5) Determinar a importância do módulo regulatório CDK8 do Mediador na adaptação da levedura ao stress pelo arsénio;
- 6) Investigar o papel regulador do módulo CDK8 na actividade do Yap8.

2. Materiais e Métodos

2.1 Estirpes e condições de crescimento

As estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste estudo estão indicadas na tabela 2.1. Os inóculos celulares foram incubados a 30°C em meio completo *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) [extracto de levedura 1% (BD Biosciences), bacto-peptona 2% (BD Biosciences), glucose 2% (VWR)], em meio sintético completo (MSC) [*yeast nitrogen base* (YNB) 6,7 g/L (BD Biosciences), casCAA 0,6% (BD Biosciences), glucose 2%, triptofano 0,02% (Sigma), adenina 0,01% (Sigma), uracilo 0,02% (Sigma)], meio rico com casaminoácidos não suplementado com uracilo (CAA-Ura) (YNB 6,7g/L, casCAA 0,6%, glucose 2%, triptofano 0,02%, adenina 0,01%), ou meio sintético “drop-out” (SD) [(arginina 0,02% (Sigma), isoleucina 0,03% (Sigma), lisina 0,03% (Sigma), metionina 0,02% (Sigma), fenilalanina 0,05% (Sigma), treonina 0,2% (Sigma), tirosina 0,03% (Sigma), valina 0,15% (Sigma), glucose 2%, YNB 6,7g/L] suplementado com os aminoácidos apropriados de acordo com a auxotrofia das diferentes estirpes. A estirpe de *Escherichia coli* XL1-Blue (genótipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lacI [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tet_r)]*, Stratagene) foi usada como hospedeira para os procedimentos de amplificação e clonagem de DNA. As culturas celulares bacterianas foram incubadas a 37°C em meio Luria-Bertani (LB) [triptona 1% (Merck), extracto de levedura 0,5%, NaCl₂ 0,5% (Merck), pH 7,5]. Para selecção dos plasmídeos utilizados neste estudo foi adicionado antibiótico ampicilina (Sigma) ou canamicina (AppliChem) numa concentração final de 100µg/mL e 50µg/mL, respectivamente.

Tabela 2.1: Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste estudo.

Estirpe	Genótipo	Referência
W303-1A	MATa <i>ura3 lys2 his4 leu2 spt13::LEU2</i>	Leroy <i>et al</i> , 2006
DY3168 (<i>med14</i>)	MATa <i>his3 leu2 ura3 ade2 trp1 can1-100 lys2 med14-100</i>	Leroy <i>et al</i> , 2006
BY4742	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
BY4742 (<i>med2</i>)	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 YDL005c::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742 (<i>med3</i>)	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 YGL025c::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742 (<i>med5</i>)	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 YGL151w::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742 (<i>med15</i>)	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 YOL051w::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742 (<i>med16</i>)	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 YNL236w::kanMX4</i>	EUROSCARF

Tabela 2.1: Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste estudo (continuação).

Estirpe	Genótipo	Fonte
Y190	MAT α , <i>ura3-52 his3-200 lys2-801 ade2-101 trp1-901 leu2-3 112 gal4Δ met-, gal80Δ LYS2::GAL1UAS-HIS3TATA-HIS3, URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ</i>	Clontech
SEY6210	MAT α <i>leu2-3 -112ura3-52 his3Δ200 trp1-Δ901 lys2-801 suc2-Δ9 Mel^r</i>	Shahi <i>et al</i> , 2010
PSY42 (<i>med12</i>)	MAT α <i>leu2-3 -112ura3-52 his3Δ200 trp1-Δ901 lys2-80 Mel^r med12Δ::kanMX4</i>	Shahi <i>et al</i> , 2010
PSY56 (<i>med13</i>)	MAT α <i>leu2-3 -112ura3-52 his3Δ200 trp1-Δ901 lys2-80 Mel^r med12Δ::kanMX4</i>	Shahi <i>et al</i> , 2010
PSY50 (<i>cycC</i>)	MAT α <i>leu2-3 -112ura3-52 his3Δ200 trp1-Δ901 lys2-801 Mel^r cycCΔ::kanMX4</i>	Shahi <i>et al</i> , 2010
PSY79 (<i>cdk8</i>)	MAT α <i>leu2-3 -112ura3-52 his3Δ200 trp1-Δ901 lys2-801 Mel^r cdk8Δ::TRP1</i>	Shahi <i>et al</i> , 2010

2.2 Plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho

Uma listagem dos oligonucleótidos utilizados neste trabalho, assim como dos plasmídeos utilizados e construídos, é fornecida nas tabelas 2.2 e 2.3, respectivamente. Os genes *MED2*, *MED3*, *MED5*, *MED14*, *MED16* e *YAP8* foram amplificados por PCR a partir de 50ng de DNA genómico da estirpe BY4742. A construção *YAP8-c-MYC* foi obtida após amplificação do 50ng do plasmídeo pRSYAP8 utilizando os oligonucleótidos indicados. A reacção de PCR foi executada utilizando-se 25pmol de cada oligonucleótido (STABvida), 0,25mM de dNTPs (Invitrogen), 0,025 unidades (U) de Phusion (Finnzymes) e as condições indicadas pelo fabricante. Os ciclos de PCR foram realizados no termocilador Trio-Thermoblock (Biometra). Os respectivos DNAs molde foram desnaturados durante 1 min a 98°C e foram efectuados 35 ciclos de repetição dos passos 10 seg a 98°C, 30 seg a 50°-59°C (de acordo com a temperatura de *melting* de cada oligonucleotídeo) e 1-3 min a 72°C (de acordo com o tamanho do fragmento a ser amplificado), terminando-se com uma extensão final de 10 min a 72°C.

Tabela 2.2: Oligonucleótidos utilizados neste trabalho.

Gene	Sequência	Utilização
<i>ACR2</i>	5' aacgtctaggcaactcaaggg3' 5' gcttgaggagctcaaccactaa3'	Sonda para <i>Northern-blot</i>
<i>YAP8</i>	5' gaagccttcacttactc3' 5' cattaagggtcttttcgtc3'	Sonda para <i>Northern-blot</i>
<i>U3</i>	5' gaatccaacttggtgatgagtc3' 5' ccatagagccctatccctcaaaa3'	Sonda para <i>Northern-blot</i>
<i>MED2</i>	5' ccacccgggatggtagtacaaaatagcc3' 5' ccacccgggctatatattgaagccgctg3'	Construção <i>GADMED2</i>
<i>MED3</i>	5' gggatggactcgattataacc3' 5' gggtcacaaatccatgttcag3'	Construção <i>GADMED3</i>
<i>MED5</i>	5' gggatcgaaaaagaatcagt3' 5' gggtcagaatacgcagtgtttc3'	Construção <i>GADMED5</i>
<i>MED14</i>	5' gggatgactaccacgatagg3' 5' gggctaagatgaacttgagttcg3'	Construção <i>GADMED14</i>
<i>MED16</i>	5' gggatgatgcttgagagca3' 5' gggtcagccgtccatctcaaaa3'	Construção <i>GADMED16</i>
<i>YAP8</i>	5' ccacccgggatggcaaaaccgcgtggaa3' 5' ccacccgggtataattttgacgaaaag3'	Construção <i>GADYAP8</i>
<i>YAP8</i>	5' gtagccatggcaaaaccgcgtggaagaaaag3' 5' cccggtcgacaatatattataattttgacga3'	Construção <i>GBDYAP8</i>
<i>YAP8</i>	5' ctaggcaactcaagggcc3' 5' catctagagtcgaccctagtacaagaccgcc3'	Construção <i>YAP8-c-MYC</i> , 2µ
<i>MED2</i>	5' cggtgaccgaggtgaataat3' (A1) 5' cgttataaaccgcgcaaaaa3' (A4) 5' cctcagcggcttcaatataatgtaccatac gatgttcag attacgcttagcttggtcttctattgt3' (MED2HA_FW) 5' acaataggaagaccaagctaagcgtaatctggaacatcg tatgggtacatctattgaagccgctg3' (MED2HA_RV)	Construção <i>MED2-HA</i>

Tabela 2.3: Plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho.

Plasmídeo	Descrição	Fonte
pGADT7	Domínio de activação do Gal4 fusionado com HA, 2 μ (<i>GAD-HA</i>)	Clontech
pGBKT7	Domínio de ligação ao DNA do Gal4 fusionado com <i>c-MYC</i> , 2 μ (<i>GBD-c-MYC</i>)	Clontech
pGADMED2	<i>GAD-HA-MED2</i>	Este estudo
pGADMED3	<i>GAD-HA-MED3</i>	Este estudo
pGADMED5	<i>GAD-HA-MED5</i>	Este estudo
pGADMED14	<i>GAD-HA-MED14</i>	Este estudo
pGADMED16	<i>GAD-HA-MED16</i>	Este estudo
pGADYAP8	<i>GAD-HA-YAP8</i>	Este estudo
pGBDYAP8	<i>GBD-c-MYC-YAP8</i>	Este estudo
pSH18.34	Gene <i>reporter lacZ</i> com o <i>LexA_{op}-lacZ</i> , 2 μ	Gyuris <i>et al</i> , 1993
pRSYAP8	<i>YAP8-c-MYC, CEN</i>	Amaral <i>et al</i> , não publicado
YEpl95YAP8	<i>YAP8-c-MYC</i> , 2 μ	Este estudo
pRSMED2	<i>MED2-HA, CEN</i>	Este estudo
<i>lexAYAP8</i>	Domínio de ligação ao DNA do LexA fusionado com <i>YAP8</i>	Menezes <i>et al</i> , 2004
pRS416	<i>CEN</i>	Stratagene
YEplac195	2 μ	Stratagene

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o kit DNA Clean & Concentrator (ZymoResearch). A construção *MED2-HA* foi obtida através da amplificação do gene *MED2* utilizando-se 50ng do DNA genómico da estirpe BY4742. Duas reacções de PCR foram efectuadas separadamente utilizando-se os conjuntos de oligonucleótidos A4/Med2HA_FW (produto 1) e A1/Med2HA_RV (produto 2). Após a purificação do DNA conforme descrito acima, foi realizada um novo PCR onde os produtos 1 e 2 foram utilizados como DNA molde. 500ng dos respectivos plasmídeos (indicados na tabela 2.3) foram digeridos com 1U de SmaI (Fermentas) durante 1h a 30°C e a enzima foi inactivada durante 5 min a 65°C. A reacção de ligação foi realizada utilizando-se 50ng do respectivo vector linearizado, os produtos de PCR e 1U da enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs) de acordo com as recomendações do fabricante e o seguinte programa: 1h a 22°C, 14h a 16°C e 10 min a 65°C para inactivação da enzima ligase. Os produtos de ligação foram transformados por choque térmico a 42°C durante 45 seg em células de *E. coli* competentes. Após 2 min em gelo foram adicionados 800 μ L de SOC [bacto-triptona 2% (Difco), extracto de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM (Merck), MgCl₂ 10mM (Sigma), MgSO₄ 10mM (Sigma), glucose 0,4%], as células foram incubadas durante 1h a 37°C com agitação e sedimentadas por centrifugação durante 10 min a 1000g.

Após ressuspensão do *pellet* em aproximadamente 100µl de água, as células foram plaqueadas em meio LB suplementado com agár 2% (BD Biosciences) e ampicilina ou canamicina. As placas foram incubadas durante 16h a 37°C. Colónias isoladas de *E. coli* contendo os respectivos plasmídeos foram inoculadas em meio LB contendo o antibiótico apropriado e foram efectuadas mini-preparações dos plasmídeos com o kit ZR Plasmid Miniprep (ZymoResearch). Os plasmídeos foram submetidos a análise com enzimas de restrição e os clones com o padrão de restrição desejados foram sequenciados.

2.3 Preparação e transformação de células competentes de levedura

Foram efectuados pré-inóculos celulares em 2 mL de YPD que foram incubados durante 16h a 30°C com agitação. As culturas de células foram diluídas posteriormente até uma densidade de $0,2 \times 10^7$ células/mL em 10 mL do mesmo meio e novamente incubadas nas mesmas condições até alcançarem uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) correspondente a $0,7-1 \times 10^7$ células/mL. As suspensões de células foram sedimentadas por centrifugação a 3000g durante 5 min e lavadas duas vezes com 1 mL de água bidestilada estéril. Foi efectuada mais uma lavagem com 1 mL de solução TE/AcLi [Tris Base 10mM, EDTA 1mM (Merck), Acetato de Lítio 0,1M (Sigma)], o *pellet* foi ressuspensionado em 200 µL de TE/AcLi e as suspensões foram incubadas durante 10 min em gelo. Foram adicionados 1µg DNA, 50µg de DNA de esperma de salmão (Sigma) e 300µL de solução PEG3350 40% (Sigma). Os tubos foram incubados durante 30 min a 30°C com agitação e as células foram submetidas a um choque térmico a 42°C durante 15 min em banho-maria. Após centrifugação a 3000g durante 2 min o *pellet* foi ressuspensionado em 200µL de água bidestilada estéril. As células foram plaqueadas em meio selectivo e incubadas a 30°C durante 48h.

2.4 Análises fenotípicas

Pré-inóculos das estirpes selvagem BY4742, W303-1A e SEY6210 e respectivos mutantes foram efectuados em 2 mL de MSC e incubados durante 16h a 30°C com agitação. Os pré-inóculos foram diluídos para uma densidade de $0,1 \times 10^7$ células/mL em 2 mL do mesmo meio e incubados novamente nas mesmas condições até as culturas alcançarem uma DO_{600} correspondente a $0,4-0,5 \times 10^7$ células/mL. As culturas foram serialmente diluídas e aproximadamente 5000, 500 e 50 células foram inoculadas em MSC sólido (como descrito acima, com adição de agár 2%) suplementado com: Na_2HAsO_4 (Sigma) e $NaAsO_2$ (Merck) numa concentração final de 0,5, 1, 1,5 e 2mM; 20µM de $CdCl_2$ (Fluka); 700µM de H_2O_2 (Sigma); 0,8M de NaCl e 1mM de $CoSO_4$ (Fluka). As placas de Petri foram incubadas a 30°C ou a 37°C de forma a induzir choque térmico e o crescimento celular foi monitorizado após 48h.

2.5 Ensaio de trans-activação em meio sólido

Células expressando os respectivos plasmídeos recombinantes foram inoculadas em 20 mL de meio de crescimento líquido SD-Ura-Leu (como descrito acima e suplementado com histidina 0,02%, triptofano 0,02% e adenina 0,01%) e incubadas durante 16h a 30°C com agitação. Após esse período, a DO₆₀₀ foi monitorizada e procedeu-se a centrifugação do volume de cultura necessário para a obtenção de $4,5 \times 10^7$ células por cada *spot*. O *pellet* foi ressuscitado em 5µL do mesmo meio e todo o volume foi plaqueado em placas de SD-Ura-Leu suplementadas com 1mM de arsenato ou arsenito. As placas foram incubadas a 30°C durante 3h e cada placa foi coberta com solução *over-lay* [5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopiranosido (x-Gal) 2mg/mL (ImmunoSource) dissolvido em dimetilsulfóxido (J.T.Baker), SDS 0,2% (Sigma), agarose 1% (Lonza) e tampão LacZ (1mM de sulfato de magnésio (Sigma), 10mM de cloreto de potássio (Sigma), 100mM de tampão fosfato (Sigma)]. As placas foram incubadas a 37°C até ao aparecimento de cor azul.

2.6 Ensaio de trans-activação em meio líquido

As células foram inoculadas em meio selectivo durante 16h a 30°C com agitação. As suspensões celulares foram diluídas para uma DO₆₀₀ igual a 0,1 e novamente incubadas até alcançarem uma DO₆₀₀ entre 0,4-0,5. Foram efectuadas alíquotas de 1mL para tubos Eppendorf e o stress foi induzido pela adição de 1mM de arsenato ou arsenito durante 1h. As células foram centrifugadas a 3000g por 5 min e ao *pellet* foi adicionado 1mL de tampão LacZ. 500µL de suspensão foram transferidos para novos tubos Eppendorf, ao qual foram adicionados 15µL de clorofórmio 100% (Riedel-de Haen). As células foram permeabilizadas mediante agitação intensa no *vortex* 2 vezes durante 10 seg com um intervalo de 1 min em gelo. Foram adicionados 75µl de uma solução de o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) (Sigma) 3 mg/ml e foi monitorizado o tempo necessário para o aparecimento de cor amarela. A reacção foi interrompida pela adição de 75µL de carbonato de sódio 1M (Sigma) e foi monitorizada a DO₄₂₀ e a DO₅₅₀ do sobrenadante após centrifugação para separação das células e do clorofórmio. Aos restantes 500µl de suspensão celular, procedeu-se à leitura da DO₆₀₀. Os cálculos para a determinação da actividade da enzima β-Galactosidase foram efectuados através da fórmula
$$\frac{(DO_{420} - (1,75 \times DO_{550})) \times 1000}{t \times v \times DO_{600}}$$
 onde t = tempo de reacção e v = volume de reacção.

2.7 Ensaio de Two-hybrid

A estirpe de *S. cerevisiae* Y190 foi co-transformada com um dos plasmídeos codificando o domínio de activação do Gal4 (série pGAD) e outro codificando o domínio de ligação ao DNA do Gal4 (série pGBD), conforme descrito na secção 2.2. As células foram plaqueados em meio SD-Leu-

Trp (conforme descrito acima e suplementado com histidina 0,02%, uracilo 0,02%, adenina 0,01% e agár 2%) e incubadas durante 48h a 30°C.

As células expressando os plasmídeos recombinantes foram inoculadas em 5 mL de meio SD-Leu-Trp e incubadas durante 16h a 30°C com agitação. Após esse período foi monitorizada a DO_{600} e centrifugaram-se os volumes necessários para a obtenção de 9×10^7 células por cada *spot*. Para a monitorização da actividade da β -Galactosidase foi utilizado um procedimento semelhante ao descrito na secção 2.5. O *pellet* de células foi ressuscitado em 7,5 μ L do mesmo meio de crescimento e todo o volume foi plaqueado em meio SD-Leu-Trp suplementado ou não com 1mM de arsenato. As placas foram incubadas a 30°C durante 3h, cada placa foi coberta com a solução *over-lay* previamente descrita e as placas foram incubadas a 37°C até ao aparecimento de cor azul.

2.8 Northern-Blot

As células foram inoculadas em 30 mL de MSC a 30°C com agitação. Após 16h, as culturas foram diluídas para uma DO_{600} igual a 0,1 e novamente incubadas até atingirem uma DO_{600} entre 0,4-0,5. O stress foi induzido por 1h com a adição de arsenato ou arsenito numa concentração final de 1mM. As culturas foram centrifugadas a 3000g durante 2 min. Foram adicionados 350 μ L de uma mistura de fenol ácido e clorofórmio na proporção 5:1 (Sigma), 350 μ L de tampão LETS [LiAc 0,1M (Sigma), Na_2EDTA 0,01M (Merck), Tampão Tris-HCl 0,01M (Roche) pH 7,4, SDS 0,2% (Sigma)] e esferas de vidro até cobrir o *pellet* de células. Os tubos foram vortexados à velocidade máxima durante 12 min a 4°C e foram incubadas em gelo durante 10 min. As amostras foram centrifugadas a 15000g durante 10 min a 4°C e a fase aquosa das suspensões foi transferida para novos tubos Eppendorf com 1mL de etanol frio 100% (Carlo Erba) e a precipitação do RNA ocorreu durante a noite a -80°C. As amostras foram centrifugadas a 17000g durante 15 min a 4°C, o *pellet* de RNA foi lavado com 200 μ L de etanol 70% (Carlo Erba) e as amostras foram novamente centrifugadas. O RNA foi ressuscitado em 50 μ L de água bidestilada estéril tratada com DEPC (Sigma) e quantificado no módulo Take3 do aparelho Epoch (BioTeka) de acordo com as recomendações do fabricante. 40 μ g de RNA foram desnaturadas a 65°C durante 10 min com *loading buffer* [formamida 53% (Fluka), MOPS 0,02M (Sigma), NaOAc 5mM (Sigma), EDTA 1mM, formaldeído 17% (Merck), TDW 0,7%, glicerol 0,7% (Merck), azul de bromofenol 0,004%, brometo de etídeo 0,03 mg/mL (Sigma)]. As amostras foram aplicadas num gel de formaldeído (agarose 1%, MOPS 0,02M, NaOAc 5mM, EDTA 1mM, e formaldeído 50%, pH 7-7,5) e a corrida electroforética foi realizada durante 3h a 90V, utilizando-se o tampão de corrida MOPS (MOPS 0,02M, NaOAc 5mM, EDTA 1mM). O gel de formaldeído foi cortado de acordo com o padrão de migração do RNA e foi visualizado num transiluminador de UV de forma a confirmar a integridade do RNA. O excesso de formaldeído foi removido mediante a incubação do gel em água bidestilada estéril durante 10 min, com agitação suave. O sistema foi montado sob o aparelho de

transferência *Trans-blot sd semi-dry transfer cell* (Biorad), utilizando-se papel de filtro 3MM (Whatman) grosso humedecido em tampão TBE 0,5x [Tris Base 0,5% (Roche), H_3BO_3 0,3% (Merck), Na_2EDTA 0,05%, pH 8] seguido da membrana de *nylon* positivamente carregada (Roche), do gel e novamente papel 3MM. A transferência foi efectuada por 30 min a 20V. O RNA foi fixado à membrana mediante uma incubação de 30 min a 120°C, que foi posteriormente pré-hibridada com 10 mL de solução Church [NaPO_4 0,25M (Merck), SDS 7%, EDTA 1mM (Merck), BSA 1% (Sigma)] no rotor a 60°C. Para a preparação das sondas, os genes *ACR2*, *YAP8* e *U3* foram amplificados utilizando-se o DNA genómico da estirpe BY4742 como molde e os oligonucleótidos apresentados na tabela 2.2. As reacções de PCR foram realizadas conforme descrito acima e os fragmentos foram purificados com o kit DNA Clean & Concentrator. As sondas foram marcadas radioactivamente seguindo as instruções do kit Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen) e purificadas em coluna G50 (GE Healthcare), conforme as indicações do fabricante. As sondas foram armazenadas em 10 mL de solução Church. As membranas foram hibridadas individualmente com cada sonda a 60°C durante a noite. Após lavagem com uma solução (NaPO_4 20mM, EDTA 1mM, SDS 0,1%) as membranas foram utilizadas para impressionar uma película fotográfica (GE Healthcare) durante 24h a -80°C numa cassette (Kodak BioMax MS Intensifying Screen). As películas foram manualmente reveladas utilizando-se as soluções reveladora e fixadora da Kodak. As membranas foram hibridadas com uma nova sonda e o processo de autoradiografia foi efectuado tal como descrito acima. A hibridação das membranas com a sonda *U3* foi realizada para normalizar o mRNA específico em cada amostra. Os sinais foram quantificados por densitometria utilizando-se o programa ImageJ disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.

2.9 Western-Blot

As células foram inoculadas em 4 mL de meio selectivo CAA-Ura e incubadas durante 16h a 30°C com agitação. As culturas de células foram diluídas até uma DO_{600} igual a 0,1 em 100mL do mesmo meio e foram incubadas até alcançarem uma DO_{600} entre 0,4 e 0,5. Foram recolhidos 50mL de cultura e aos restantes 50mL foi adicionado arsenato numa concentração final de 1mM. Após incubação durante 1h a 30°C, as células foram sedimentadas por centrifugação durante 3 min a 1200g lavadas com 1mL de ácido tricloroacético 20% (TCA) (Sigma), foram transferidas para tubos Eppendorf e novamente centrifugadas. Foram adicionados 400 μL de TCA 20% e um volume de esferas de vidro igual ao tamanho do *pellet* de células. As suspensões celulares foram agitadas durante 12 min a 15000g e a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos Eppendorf e foi centrifugado 5 min a 15000g. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados ao *pellet* 70 μL de Laemli [Tris-HCl 62,5mM pH 6,8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5% (Merck), glicerol 10% (Merck), azul de bromofenol 0,01%] e 30 μL de Tris-HCl 1M pH 8. A mistura foi agitada, fervida durante 5 min a 100°C e o *pellet*

foi sedimentado por centrifugação 3 min a 15000g. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e as proteínas foram quantificadas utilizando-se o método Bradford (Biorad). 100µg de proteínas totais foram separadas por electroforese durante 2h a 100V em gel de poliacrilamida 12% [Tris-HCl 375mM, SDS 0,1%, acrilamida 12% (Fluka), bis-acrilamida 0,3% (Sigma), persulfato de amónia 0,05% (Sigma), tetrametiletilenodiamina 0,07% (Sigma)], utilizando-se o tampão de corrida Tris-Glicina [Glicina 14% (Sigma), Tris Base 3%, SDS 1%] e o aparelho Mini-PROTEAN 3 Cell (Biorad). As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (Millipore) através do sistema *Trans-blots* *semi-dry transfer cell* (Biorad). O sistema foi montado sob o aparelho de transferência utilizando-se papel de filtro 3MM (Whatman) grosso humedecido em tampão de transferência [Tris Base 0,4%, Glicina 0,3%, metanol 10% (Sigma), SDS 0,2%] seguido de papéis 3MM finos e a membrana de PVDF. Seguidamente foram colocados o gel, 3 folhas de papel 3MM finos humedecidos e um papel 3MM grosso. A transferência foi efectuada por 1h e 30 min a 20V e a membrana foi corada com 10 mL de Ponceau S (Sigma), para controlo da qualidade da transferência. A membrana foi bloqueada com leite magro 5% (Nestlé) em PBS/Tween 0,1% (Merck) durante a noite a 4°C com agitação. A membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-c-Myc (Roche) diluído 1:1000 durante a noite a 4°C com agitação, foi lavada 3x10 min com 10 mL de PBS/Tween 0,1% e foi incubada com o anticorpo secundário anti-Mouse conjugado com a peroxidase *horseradish* (Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:5000 durante 8h a 4°C com agitação. A membrana foi lavada nas mesmas condições e o sinal da proteína foi detectado utilizando o kit *Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. A membrana foi utilizada para impressionar uma película fotográfica (GE Healthcare) numa cassette (Kodak BioMax MS Intensifying Screen) durante o tempo necessário para a obtenção de sinal, e as películas foram manualmente reveladas utilizando-se soluções reveladora e fixadora da Kodak. Para a detecção das proteínas contendo o epítipo HA, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-HA conjugado com peroxidase (Roche) diluído 1:1000 durante a noite a 4°C com agitação e a membrana foi lavada e revelada conforme descrito acima. O anticorpo anti-αSb1 foi utilizado como controlo interno para normalizar os níveis de proteína.

2.10 Co-imunoprecipitação

As células (estirpe BY4742) co-transformadas com os plasmídeos YEp195YAP8 e um dos plasmídeos da série pGAD foram inoculadas em 5mL de meio líquido SD-Ura-Leu durante 16h a 30°C com agitação, e as culturas foram diluídas para uma DO₆₀₀ equivalente a $0,1 \times 10^7$ células/mL. As culturas foram incubadas a 30°C até uma DO₆₀₀ correspondente a $0,4-0,5 \times 10^7$ células/mL. Foram recolhidos 50 mL de cultura e aos restantes 50 mL foi adicionado 1mM arsenato. As células foram incubadas por 30 min a 30°C, sedimentadas por centrifugação a 3000g durante 2 min a 4°C e lavadas

com 1 mL de PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 4,3mM, KH₂PO₄ 1,47mM) frio. Foram adicionados 150µL de tampão de lise [Tris 20mM, NaCl 150mM, Nonidet P-40 0,5% (Sigma), EDTA 2mM, glicerol 10%] e esferas de vidro num volume igual ao volume do *pellet* de células. As misturas foram agitadas durante 12 min a 15000g e a 4°C e os extractos foram centrifugados durante 20 min a 15000g a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos Eppendorf e a proteína foi quantificada como descrito na secção 2.9. 500µg de proteína total foram diluídas em 500µL de tampão lise e foram incubadas durante a noite a 4°C no rotor à velocidade mínima com 60µL de anticorpo anti-c-Myc conjugado com proteína A adsorvida em esferas de agarose (Clontech), previamente equilibradas com tampão de lise. As proteínas co-imunoprecipitadas foram sedimentadas por centrifugação a 4°C durante 30 seg a 7000g e duas vezes lavadas com 500µL de PBS. Foram adicionados 20µL de tampão de Laemli ao *pellet* e as amostras foram fervidas durante 5 min a 80°C, para separar as esferas de agarose do complexo contendo as proteínas co-imunoprecipitadas. A mistura foi centrifugada e o sobrenadante contendo as proteínas imunoprecipitadas foi aplicado num gel de poliacrilamida 10% [Tris-HCl 0,375M, SDS 0,1%, acrilamida 10%, bis-acrilamida 0,2%, persulfato de amónia 0,05%, tetrametiletilenodiamina 0,07%] juntamente com 100µg dos extractos totais previamente fervidos durante 5 min a 100°C. A corrida electroforética foi efectuada no aparelho Mini-PROTEAN 3 Cell durante 2h a 100V utilizando-se o tampão de corrida Tris-Glicina. As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF e estas foram bloqueadas tal como descrito na secção 2.9. Primeiro procedeu-se à detecção das proteínas fusionadas com HA (imunoprecipitadas) para evitar a interferência do sinal intenso das cadeias “leve” e “pesada” do anti-corpo anti-c-Myc. Seguiu-se então com a detecção das proteínas fusionadas com c-Myc (imunoprecipitadas), de acordo com o procedimento descrito no ponto 2.9.

3. Resultados e Discussão

3.1 O complexo Mediador é necessário para a resposta da levedura ao stress induzido pelos compostos de arsénio

O complexo Mediador é um co-activador importante para a transmissão de sinais entre os reguladores transcricionais e o complexo de iniciação da transcrição (Soutourina *et al*, 2011). Sob stress por arsénio, o factor de transcrição Yap8 é acumulado no núcleo, o que resulta na activação transcricional dos genes que codificam proteínas responsáveis pela destoxificação do arsénio. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos relacionados com o recrutamento da maquinaria basal de transcrição para as regiões promotoras dos genes regulados por este factor de transcrição.

A cauda do Mediador é a subunidade deste complexo proteico que é capaz de reconhecer e se ligar a diversos factores de transcrição (Biddick e Young, 2005). De facto, Herbig e os seus colaboradores mostraram que o factor de transcrição Gcn4, o protótipo dos factores de transcrição AP-1 em *S. cerevisiae*, liga-se directamente às subunidades Med15 e Med16 da cauda do Mediador (Herbig *et al*, 2010).

Para avaliar a possível necessidade do complexo Mediador para a activação de genes envolvidos na adaptação da levedura ao stress induzido pelos compostos de arsénio, foram realizados ensaios fenotípicos, onde foi comparado o padrão de crescimento da estirpe selvagem e dos vários mutantes para as subunidades da cauda do Mediador, em presença de arsénio. Os resultados apresentados na figura 3.1A mostram claramente que as subunidades Med2, Med3, Med15, Med16 e Med14 da cauda do Mediador são necessárias para a adaptação da célula ao stress provocado pelos compostos de arsénio. A eliminação do gene *MED16* parece provocar uma sensibilidade mais severa que a deleção dos outros *MEDs* e isto provavelmente deve-se ao facto de que as subunidades Med2, Med3, Med15 e Med16 formam um sub-complexo que se liga ao Mediador através do Med16 (van de Peppel *et al*, 2005). Uma vez que a deleção do gene *MED14* é letal, foi utilizado o mutante *med14-100*, que codifica uma proteína com actividade parcial. Este mutante apresentou uma grande sensibilidade ao arsénio, o que indica que a sua função intacta é importante para a adaptação da levedura ao stress induzido por este metalóide.

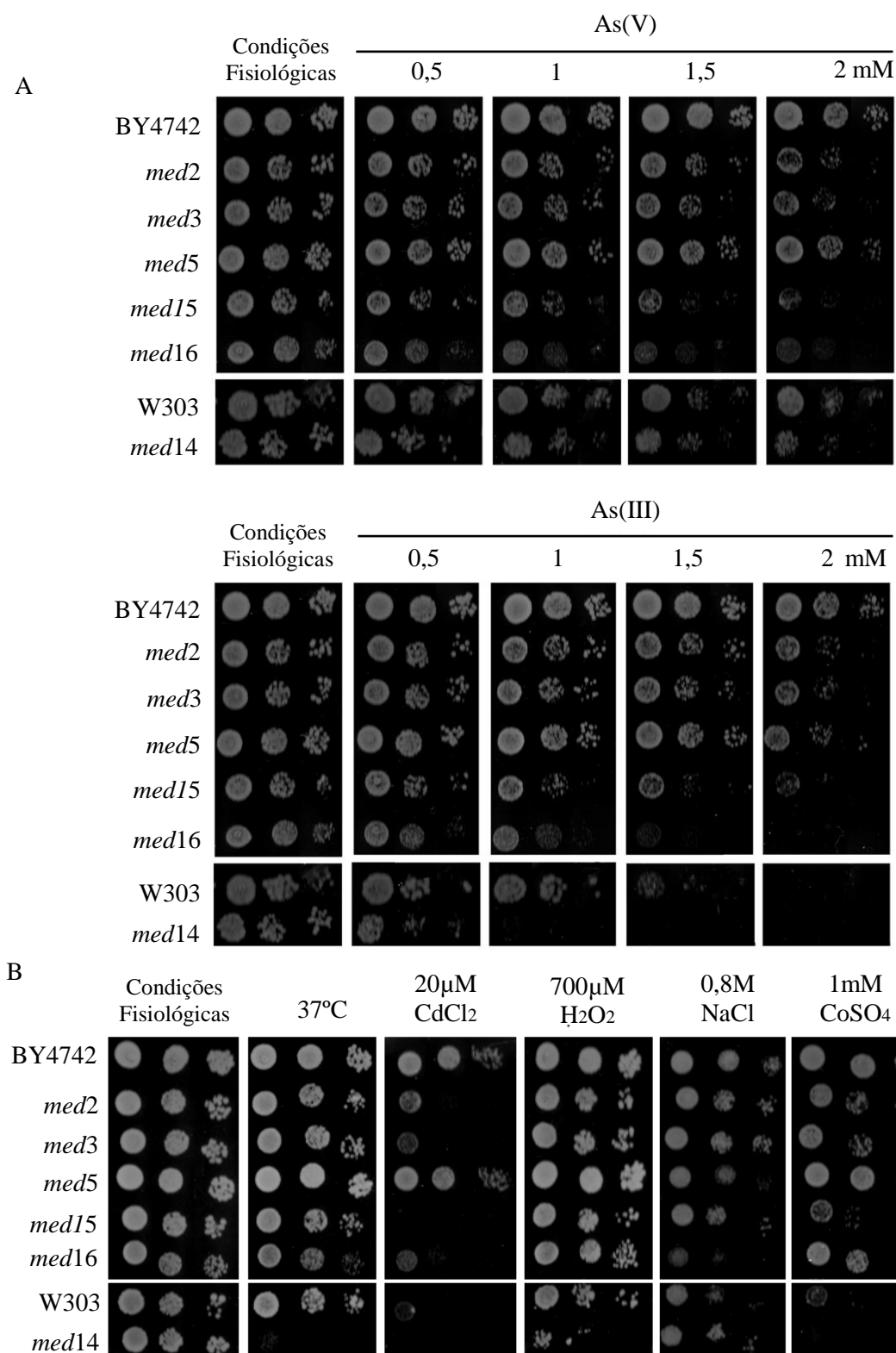


Figura 3.1: A subunidade da cauda do Mediador é necessária para a resposta da levedura ao stress por arsénio. As estirpes selvagens e mutantes foram incubadas em meio sintético completo até à fase exponencial, foram serialmente diluídas conforme descrito na secção 2.4 dos materiais e métodos e foram plaqueadas em meio contendo: A) concentrações crescentes de Na₂HAsO₄ (arsenato) ou NaAsO₂ (arsenito) B) 1 mM de CoSO₄, 20 µM de CdCl₂, 0.8 M de NaCl ou 700 µM H₂O₂. O crescimento foi monitorizado após 48h de crescimento a 30°C ou a 37°C de forma a induzir choque térmico.

O mutante *med5* apresentou um crescimento semelhante ao da estirpe selvagem, de onde se pode concluir que a sua função seja dispensável para adaptação ao stress induzido pelos compostos de arsénio. Curiosamente, existe uma controvérsia quanto à localização da subunidade Med5 na estrutura do Mediador. Enquanto alguns autores defendem que esta subunidade pertence à cauda do Mediador (Béve *et al*, 2005), outros afirmam que esta pertence ao domínio intermédio (Chadick e Asturias, 2005). Admitindo-se a segunda hipótese, pode-se concluir que o domínio da cauda do Mediador participa na activação de genes que são essenciais para adaptação das células ao stress imposto pelos compostos de arsénio.

Com o objectivo de se avaliar a especificidade do requisito das subunidades da cauda do Mediador para a adaptação da levedura a diferentes agressões ambientais, foram realizados ensaios fenotípicos na presença de vários agentes de stress designadamente cádmio, cobalto, peróxido de hidrogénio, cloreto de sódio e choque térmico. A figura 3.1B mostra que diferentes conjuntos de subunidades da cauda do Mediador são importantes nas diferentes condições de stress. Por exemplo a subunidade Med15 é essencial para a sobrevivência da célula ao stress induzido pelo cádmio mas parece ser dispensável para adaptação das células ao stress hiperosmótico ou oxidativo. Por sua vez, a redução da actividade da subunidade Med14 parece não influenciar o crescimento das células expostas ao stress osmótico, mas torna-se importante na sua adaptação ao stress induzido pelo choque térmico, cádmio e cobalto. Em conjunto, estes resultados permitem afirmar que as subunidades Med2, Med3, Med15, Med14 e Med16 da cauda do Mediador são diferencialmente necessárias para a adaptação da célula ao arsénio.

3.2 Mutações nas subunidades da cauda do complexo Mediador comprometem a actividade do Yap8 mas não interferem com os níveis de mRNA e proteína

O factor de transcrição Yap8 é o principal regulador da resposta ao stress induzido pelo arsénio uma vez que activa a transcrição dos genes que codificam as proteínas que compõem a principal via de destoxificação do arsénio (Menezes *et al*, 2004). Os ensaios fenotípicos (figura 3.1) sugerem que o Mediador participa na activação de genes responsáveis pela sobrevivência da levedura ao stress induzido pelo arsénio. Em seguida, verificou-se se a eliminação dos genes que codificam as subunidades da cauda do Mediador afectavam a actividade do Yap8 e portanto a activação dos seus genes alvo. Como primeira abordagem, foram monitorizados os níveis de mRNA do gene *ACR2* por *Northern-blotting* nas estirpes selvagens e nos respectivos mutantes. A figura 3.2A revela que o nível de expressão do gene *ACR2* diminui cerca de 30-40% nas estirpes mutantes quando comparadas com a estirpe selvagem, à excepção do mutante *med5* que apresenta uma diminuição de apenas 10% nos níveis de *ACR2*.

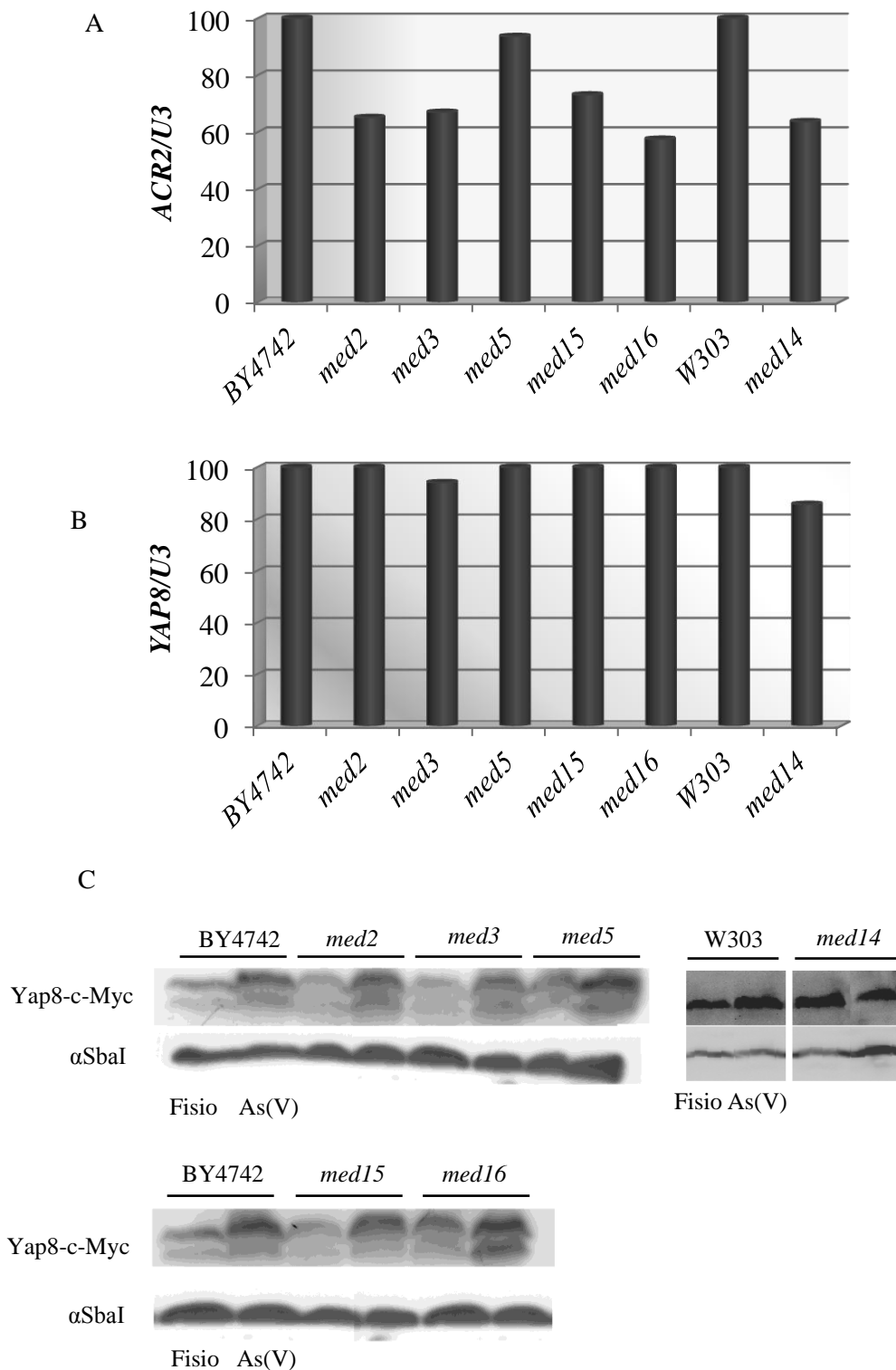


Figura 3.2: A expressão do gene *ACR2* é afectada por mutações na cauda do Mediador enquanto a expressão do *YAP8* permanece inalterada. As estirpes selvagens e mutantes em fase de crescimento exponencial foram induzidas durante 1h com 1 mM de Na_2HAsO_4 (arsenato) e o RNA foi extraído como descrito na secção 2.8 dos materiais e métodos. Para as análises por *Northern-blot* foram utilizadas sondas para mRNA do A) *ACR2* B) *YAP8* e *U3* como controlo interno dos níveis de RNA. C) As mesmas estirpes, expressando a construção *Yap8-c-Myc*, foram submetidas ao stress por arsénio nas mesmas condições que em B e os níveis de *Yap8* forma analisados por Western-blot utilizando o anticorpo anti-c-Myc. A proteína αSbaI foi utilizada como controlo interno para normalização dos resultados. Fisio – Condições fisiológicas.

Estes resultados sugerem que a actividade do Yap8 é comprometida nos mutantes das subunidades da cauda do Mediador, isto é, que o Yap8 depende do Mediador para uma activação eficaz dos seus genes alvo. No entanto, a seguinte questão se coloca: Os níveis de *ACR2* são afectados devido à redução dos níveis de Yap8 ou da sua actividade propriamente dita? Para responder a esta questão foram monitorizados os níveis de mRNA do *YAP8*, assim como os respectivos níveis de proteína nas estirpes selvagem e nos mutantes para as subunidades da cauda do Mediador por *Northern-* e *Western-blotting*, respectivamente. A figura 3.2B mostra que a expressão do *YAP8* não é significativamente influenciada por mutações na cauda do Mediador na presença de arsénio, uma vez que os níveis de mRNA permanecem inalterados em todas as estirpes testadas. Dado que o Yap8 também é regulado pela via da ubiquitina, sendo a sua degradação parcialmente inibida na presença de arsénio, os níveis de proteína Yap8 também foram monitorizados. Para tal foi utilizada a construção *YAP8-c-MYC* para permitir a detecção do Yap8 com o anticorpo anti-c-Myc. Conforme indicado na figura 3.2C, as mutações nas subunidades da cauda do Mediador não parecem influenciar os níveis de Yap8.

3.3. Mutações na cauda do complexo Mediador comprometem a actividade de trans-activação do Yap8

Os resultados apresentados na secção anterior sugerem que o Mediador não interfere com os níveis de Yap8 e portanto a redução na expressão do gene *ACR2* nas estirpes mutantes é provavelmente uma consequência de uma deficiente transmissão do sinal de indução do Yap8 para a maquinaria basal de transcrição.

Para testar esta hipótese foi realizado o ensaio de trans-activação do Yap8 nas estirpes selvagens e nos respectivos mutantes, onde os níveis de Yap8 foram mantidos constantes através do controlo da sua expressão pela região promotora constitutiva do gene *ADHI*. Este ensaio baseia-se na fusão da proteína de interesse com o domínio de ligação ao DNA da proteína LexA, capaz de reconhecer o operador do LexA inserido na região promotora de um gene *reporter* (Fernandes *et al*, 1997), neste caso o *lacZ*. Desta forma as estirpes foram co-transformadas como os plasmídeos expressando a construção híbrida, *YAP8-lexA*, sob controlo do promotor constitutivo do gene *ADHI*, e o plasmídeo repórter que codifica o gene *lacZ* (figura 3.3). De seguida procedeu-se à monitorização da actividade da enzima β -Galactosidase conforme descrito nas secções 2.5 e 2.6.

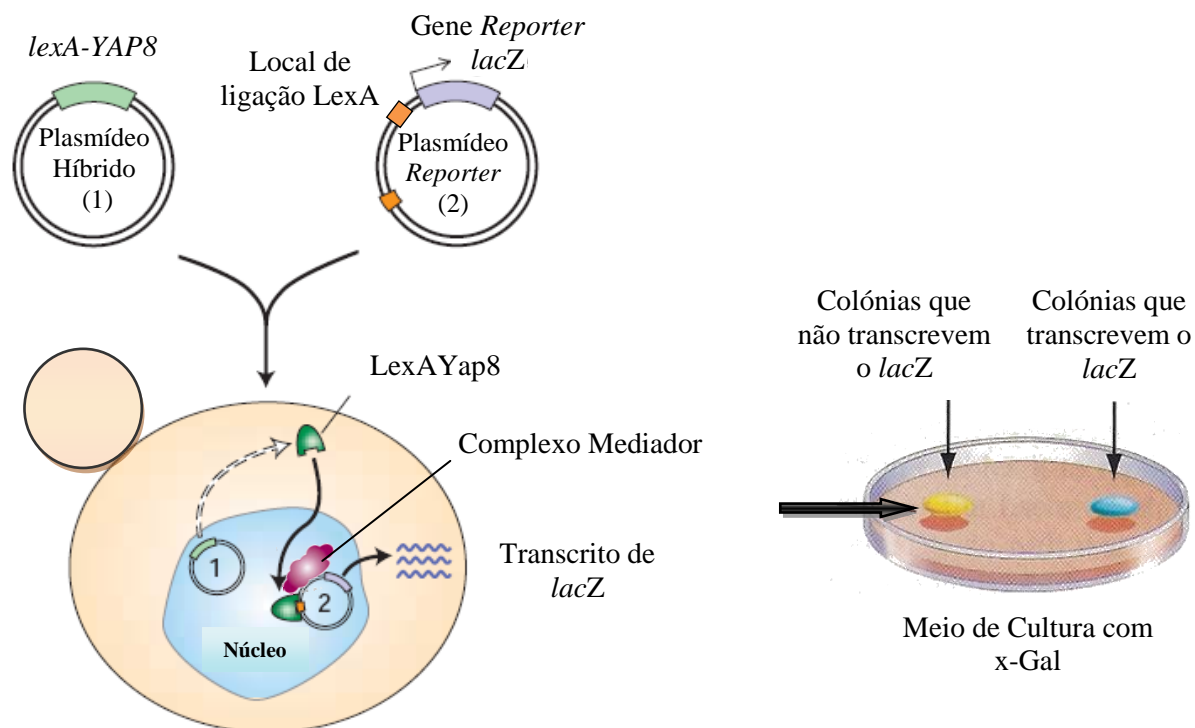


Figura 3.3: Representação esquemática do ensaio de trans-ativação em levedura (adaptado de Lodish *et al*, 2000).

Os resultados apresentados na figura 3.4 mostram que o potencial de trans-ativação do Yap8 é induzido pelos compostos de arsénio, tal como descrito na literatura (Ilina *et al*, 2008; Menezes *et al*, 2004). Nestas condições verifica-se que os mutantes que apresentam uma redução da expressão do gene *ACR2*, nomeadamente os mutantes *med2*, *med3*, *med14*, *med15* e *med16*, também exibem reduzida actividade da enzima β -Galactosidase. Os mutantes mais afectados são os *med14* e *med16* que apresentam uma redução de aproximadamente 90% da actividade da β -Galactosidase, quando comparados com as respectivas estirpes selvagens. Estes foram os mutantes que apresentaram maior sensibilidade nos ensaios fenotípicos e uma menor expressão do gene *ACR2*. Como esperado, o mutante *med5* apresentou uma actividade da β -Galactosidase similar à da estirpe selvagem. Estes resultados em conjunto sugerem que a inibição do potencial de trans-ativação do Yap8 ocasionada pela eliminação das subunidades da cauda do Mediador leva a uma redução da expressão do gene *ACR2* e da capacidade da célula em se adaptar ao stress imposto pelos compostos de arsénio.

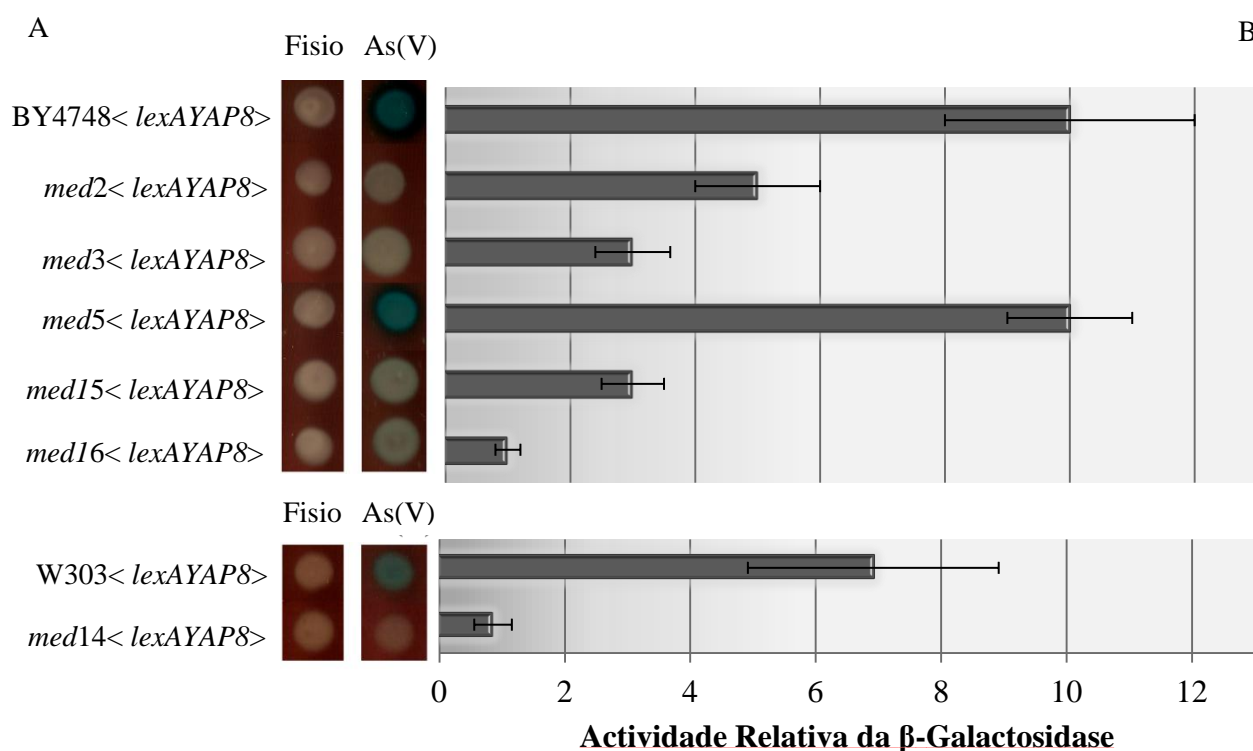


Figura 3.4: A) A perturbação das subunidades na cauda do Mediador afecta a actividade de trans-activação do Yap8. A) estirpes selvagens e mutantes co-expressando *lexA-YAP8* e *lexAop-lacZ* foram incubadas em meio SD até atingir a fase de crescimento estacionária e $4,5 \times 10^7$ células foram plaqueadas em meio suplementado com 1mM de Na_2HAsO_4 (arsenato). A monitorização da actividade da β-Galactosidase foi efectuada como descrito na secção 2.5 dos materiais e métodos após 3h de incubação a 30°C. B) A análise quantitativa da actividade β-galactosidase foi realizada utilizando células em fase de crescimento exponencial induzidas por 1h com Na_2HAsO_4 (arsenato) como descrito na secção 2.6 dos materiais e métodos. Fisio – condições fisiológicas.

3.4 A subunidade Med2 do complexo Mediador interage fisicamente com o Yap8

Herbig e os seus colaboradores mostraram que o factor de transcrição Gcn4, o protótipo dos factores de transcrição AP-1 em *S. cerevisiae*, interage directamente com as subunidades Med15 e Med16 da cauda do Mediador (Herbig *et al*, 2010). Dado as características partilhadas entre o Gcn4 e o Yap8 (Rodrigues-Pousada *et al*, 2010), foi investigado se este também era capaz de estabelecer contactos físicos com a cauda do Mediador.

Para esta finalidade, foram realizados ensaios de *two-hybrid* na estirpe de *S. cerevisiae* Y190. A estratégia *two-hybrid* é uma ferramenta molecular de identificação e caracterização da interacção física entre duas proteínas que se baseia no facto de que alguns factores de transcrição possuem os domínios de activação e de ligação ao DNA funcionalmente separados, como é o caso do factor de transcrição de levedura Gal4. Assim, cada uma das proteínas de interesse é fusionada com o domínio activação ou com o domínio de ligação ao DNA do Gal4, e a interacção entre elas leva à reconstituição do factor transcripcional Gal4 funcional capaz de activar a transcrição de genes *reporter* contendo sequências UAS_{GAL} na sua região promotora (figura 3.5) (Guglielmi *et al*, 2004). Desta forma a estirpe Y190 foi

co-transformada com um dos plasmídeos codificando o domínio de activação do Gal4 (série pGAD: pGADT7, pGADMED2, -MED3, -MED5, -MED14, -MED16, -YAP8) e outro codificando o domínio de ligação ao DNA do Gal4 (série pGBD: pGBKT7, -YAP8,) (tabela 2.3). Em seguida, foi monitorizada a activação da expressão do gene *lacZ*, através da detecção da actividade da enzima β -Galactosidase conforme descrito nas secções 2.5.

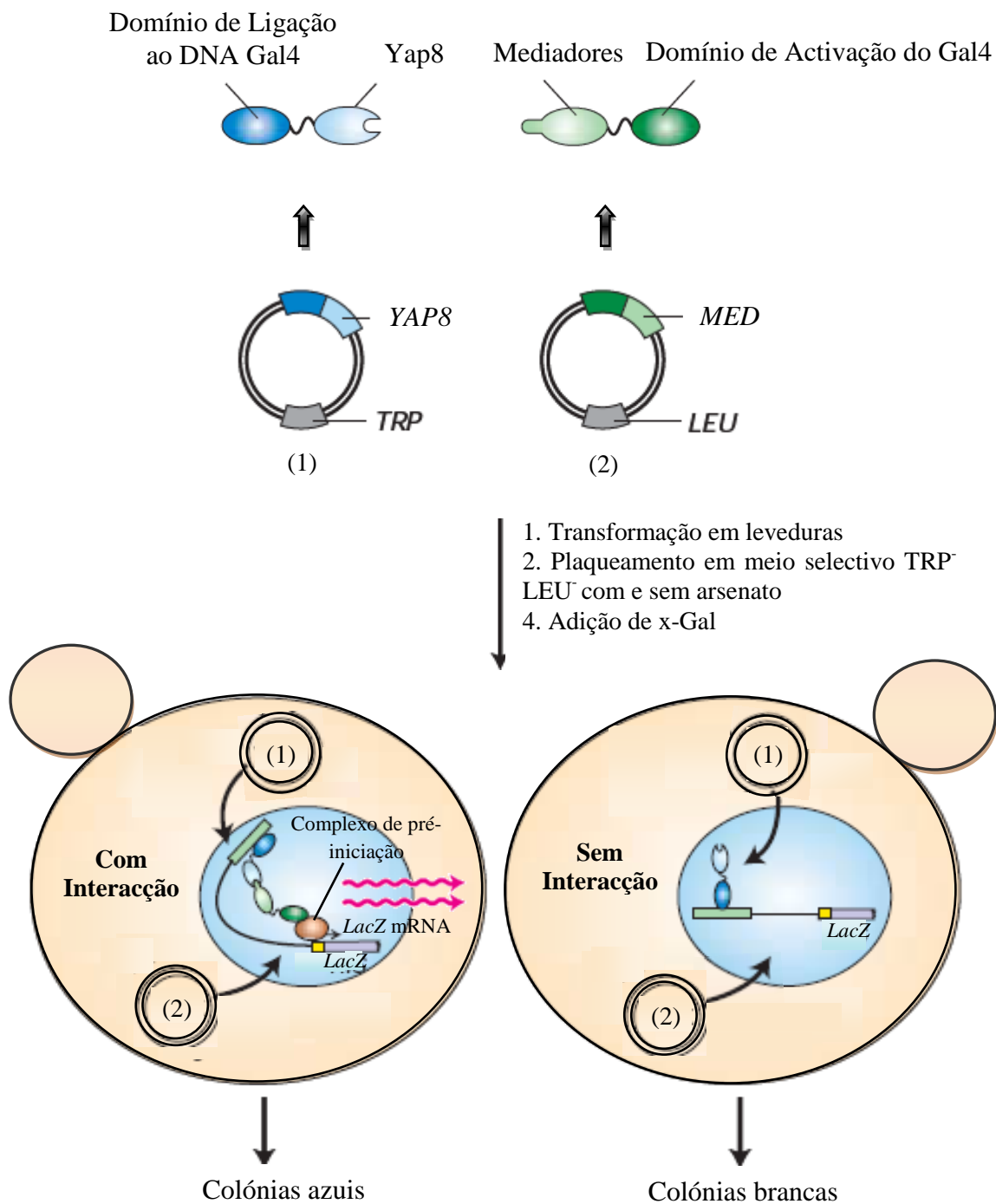


Figura 3.5: Ensaio de *two-hybrid* em levedura (adaptado de Lodish *et al*, 2000).

Os resultados apresentados na figura 3.6 mostram que o substrato x-Gal apenas é hidrolisado nas células que expressam as fusões Gal4AD-Yap8/Gal4BD-Yap8 e Gal4AD-Med2/Gal4BD-Yap8, o que reflecte a homodimerização do Yap8 (Yujun e Tamás, 2006), e sugere que apenas a subunidade Med2 do Mediador é capaz de interagir com o Yap8 nestas condições. Curiosamente, a interacção entre o Yap8 e o Med2 parece ser mais eficiente que a própria homodimerização do Yap8, uma vez que a coloração azul observada nestas células é mais intensa, sugerindo que o Yap8 deve estabelecer interacções estáveis com esta subunidade. Este resultado é coerente com o facto de a subunidade Med2 estar localizada na periferia da cauda do Mediador e possivelmente terá menor impedimento estereoquímico para estabelecer contactos com o Yap8.

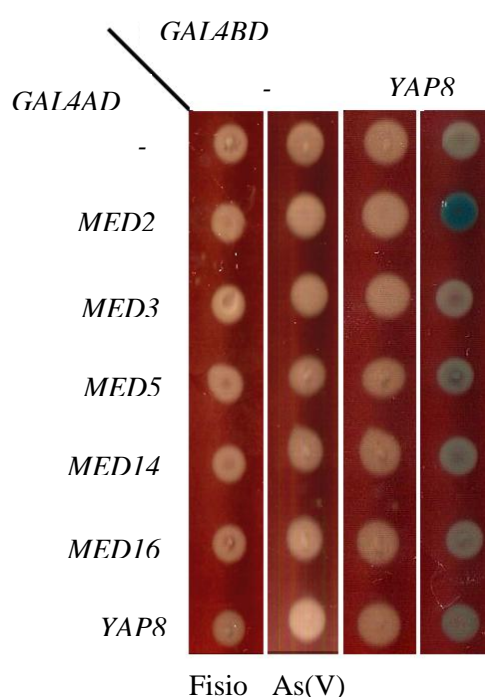


Figura 3.6: O Yap8 interage com a subunidade Med2 do Mediador no sistema *two-hybrid*. Células co-expressando a construção *GBD-YAP8-c-MYC* e uma das construções de fusão dos Mediadores *GAD-HA-MED* foram incubadas até à fase estacionária e plaqueadas numa densidade de 9×10^7 células em meio suplementado com 1mM de arsenato. A actividade da β -Galactosidase foi monitorizada como descrito na secção materiais e métodos após 3 horas de incubação a 30°C. Fisio - Condições fisiológicas.

Para validar a interacção entre o factor de transcrição Yap8 e o Med2 obtida no sistema *two-hybrid* foram efectuados ensaios de co-imunoprecipitação. Este procedimento é amplamente utilizado para monitorizar a interacção *in vivo* entre proteínas e baseia-se no princípio de que muitas das interacções proteína-proteína que existem na célula são mantidas quando a célula é lisada em condições não desnaturantes. Desta forma, se a proteína X do complexo XY é imunoprecipitada, então a proteína Y estavelmente ligada a proteína X, pode também ser precipitada (Adams e Ohh, 2005).

Neste ensaio foram utilizadas as construções *YAP8-c-MYC* e *GAD-HA-MEDs* (tabela 2.3). As proteínas foram co-imunoprecipitadas por incubação com esferas de agarose adsorvidas à imunoglobulina IgA conjugada com o anticorpo anti-c-Myc, como descrito na secção materiais e métodos (figura 3.7).

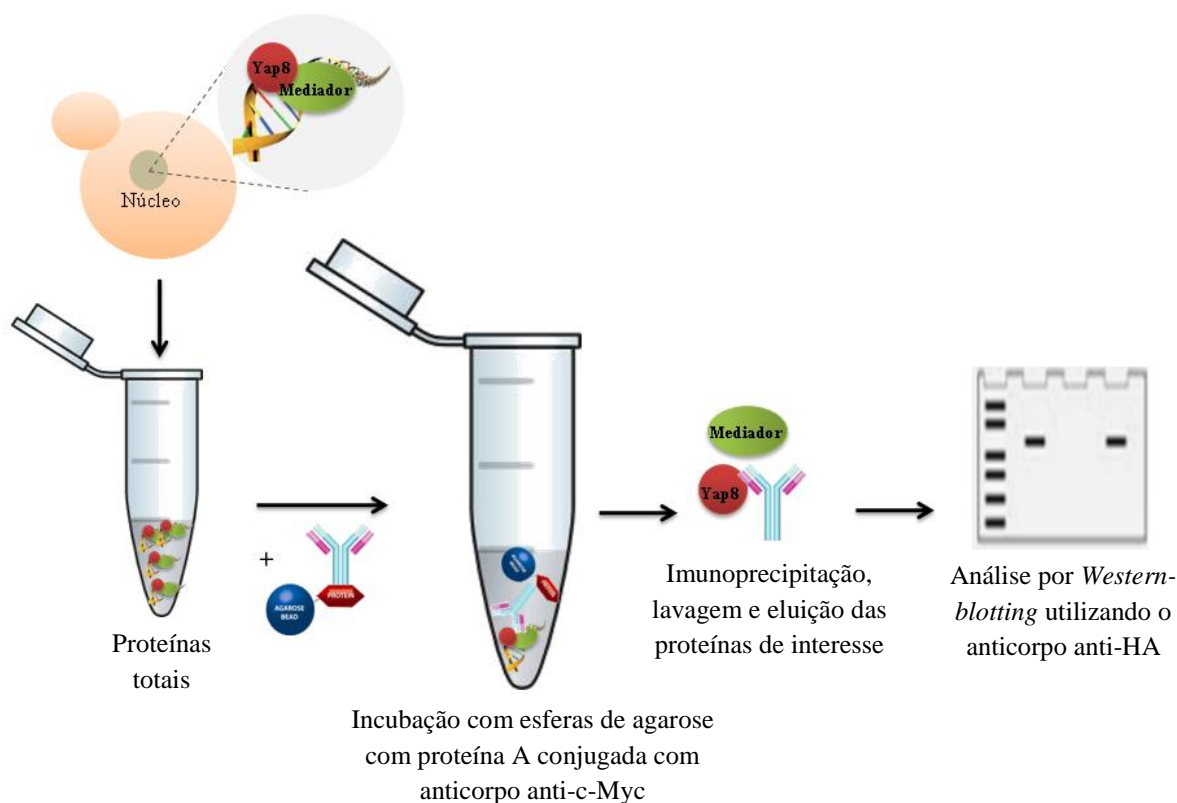


Figura 3.7: Representação esquemática do procedimento de co-imunoprecipitação.

Os resultados apresentados na figura 3.8 mostram que a imunoprecipitação do Yap8 com o anticorpo anti-c-Myc co-imunoprecipita especificamente a proteína Med2-HA, conforme observado no *blot* correspondente à revelação do anti-corpo anti-HA. Desta forma pode afirmar-se que a proteína Med2 estabelece interações estáveis com o factor de transcrição Yap8, o que vem a corroborar os resultados obtidos no ensaio de *two-hybrid*.

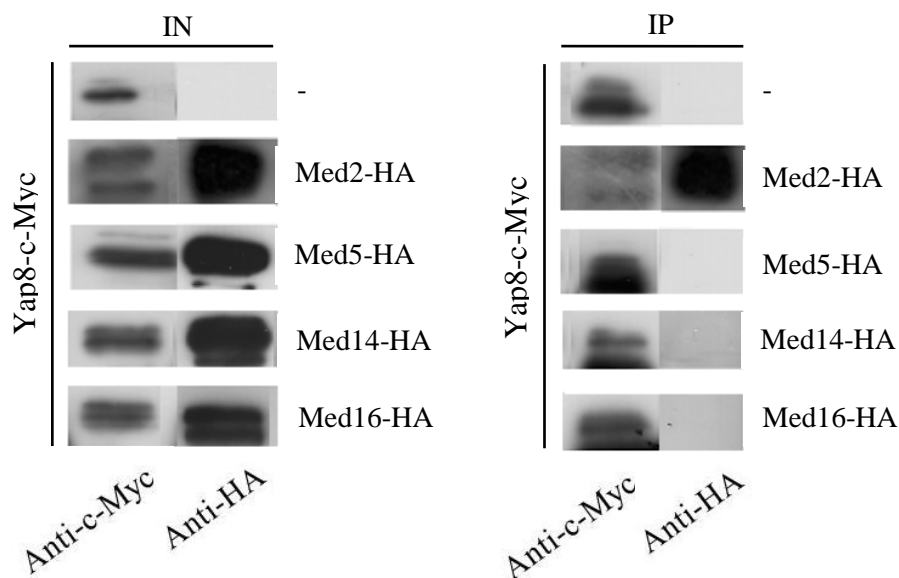


Figura 3.8: O Yap8 interage com o módulo da cauda do Mediador através da subunidade Med2. Extractos proteicos de células induzidas com arsenato co-expressando as construções *YAP8-c-MYC* e *GAD-HA-MEDs* foram incubados com o anticorpo c-Myc ou o anticorpo HA e os complexos foram purificados utilizando esferas de agarose com proteína A adsorvida. IN – input, IP – imunoprecipitação.

3.5 O módulo CDK8 é necessário para a activação de genes envolvidos na sobrevivência da levedura ao stress pelos compostos de arsénio

O complexo Mediador parece desempenhar uma função crucial na adaptação da levedura ao stress por arsénio, sendo imprescindível para a actividade do factor de transcrição Yap8. No entanto o próprio Mediador é alvo de regulação por parte do módulo CDK8 (van de Peppel *et al*, 2005). Este módulo é constituído por 4 subunidades, a Med12, a Med13, uma cinase dependente de ciclina Cdk8 e a sua ciclina CycC (Bourbon, 2008). Está descrito na literatura que o módulo CDK8 é capaz de regular o complexo Mediador de forma positiva ou negativa, revelando tratar-se de uma regulação que depende do contexto do promotor e dos factores de transcrição específicos que o regulam. Em leveduras, a cinase Cdk8 é capaz de fosforilar e modular negativamente os factores de transcrição Gcn4 e Msn2 (Chi *et al*, 2001) e a subunidade Med12 é necessária para a indução da transcrição do gene *PDR5* sob perda do genoma mitocondrial (Shahi *et al*, 2010).

De forma a investigar-se a função do módulo CDK8, como regulador positivo ou negativo do complexo Mediador recrutado pelo Yap8 para o promotor do gene *ACR2*, foram realizados ensaios fenotípicos utilizando-se a estirpe selvagem e os respectivos mutantes para o módulo CDK8 do Mediador. Os resultados apresentados na figura 3.9A indicam que os mutantes *med13*, *cycC* e *cdk8* desempenham um papel importante na adaptação da célula ao stress induzido pelos compostos de arsénio. Dada a função regulatória do módulo CDK8, este ensaio sugere que este módulo parece regular positivamente a resposta adaptativa da levedura ao stress induzido pelo arsénio.

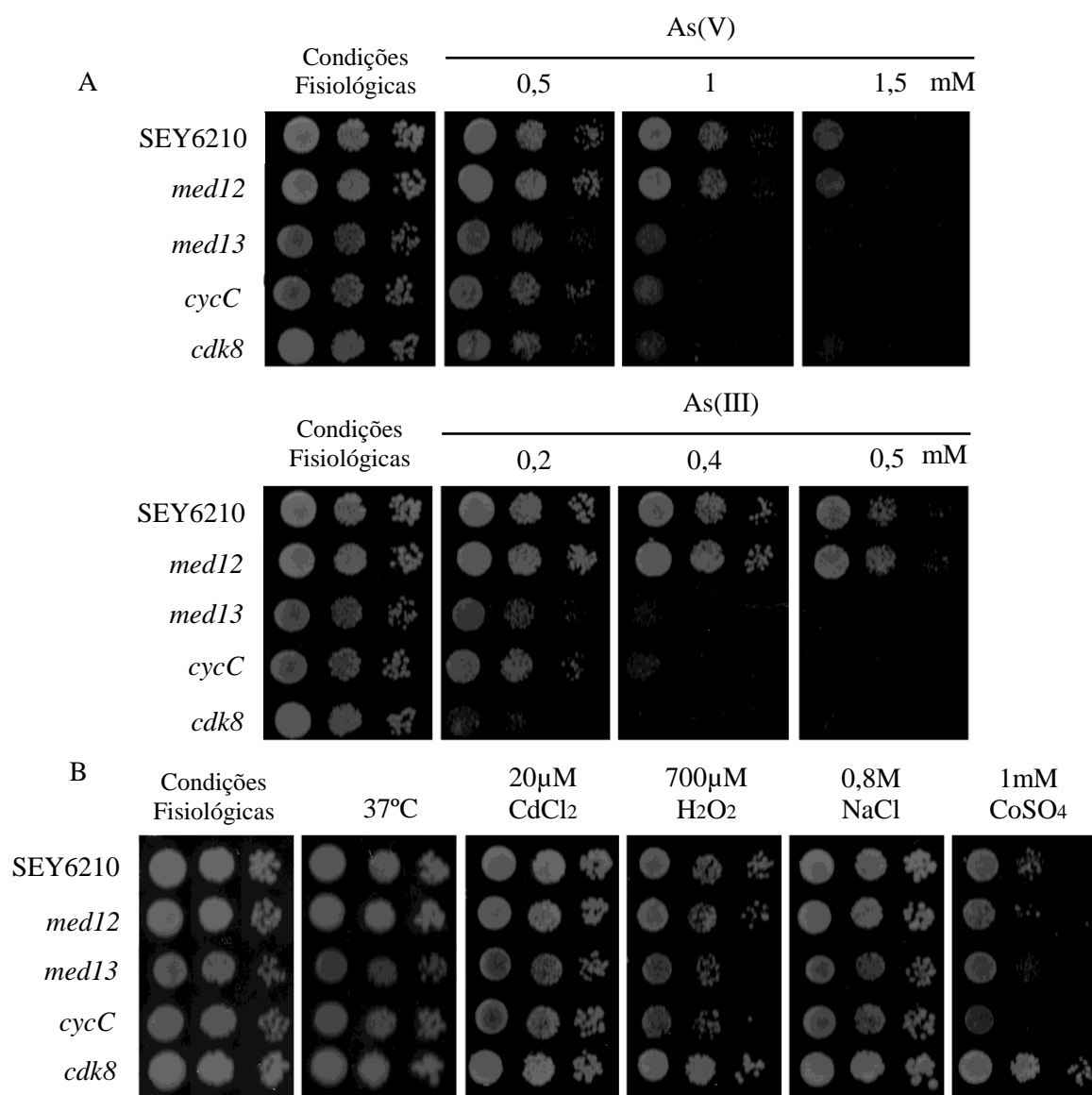


Figura 3.9: O módulo CDK8 é especificamente necessário para a adaptação da célula ao stress induzido pelos compostos de arsênio. Estirpes selvagens e mutantes foram incubadas em meio sintético completo até à fase exponencial, foram serialmente diluídas como descrito na secção materiais e métodos e plaqueadas em meio contendo A) concentrações crescentes de Na₂HAsO₄ (arsenato) ou NaAsO₂ (arsenito), B) 20μM de CdCl₂, 700μM H₂O₂, 0,8M e NaCl ou 1mM de CoSO₄. O crescimento foi monitorizado após 48 horas a 30°C ou a 37°C de forma a induzir choque térmico.

Por sua vez, os resultados evidenciados na figura 3.9B mostram que o efeito da eliminação das subunidades do módulo CDK8 parece ser específico para a resposta ao stress induzido pelo arsênio. A eliminação deste módulo não interfere significativamente com a resposta ao stress imposto pelo choque térmico, stress por cádmio e osmótico. Entretanto, a disrupção da subunidade Cdk8 confere uma maior resistência ao stress por cobalto e oxidativo, o que sugere que o módulo CDK8 deve regular negativamente algum componente da via de adaptação celular ao cobalto. A subunidade

Med12 não parece ser importante para a adaptação da levedura a nenhuma condição de stress estudado, enquanto as subunidades Med13 e CycC parecem ser mais importantes para os stresses gerados pelos compostos de arsénio e cobalto do que para os restantes.

3.6 O módulo CDK8 do complexo Mediador regula negativamente a actividade de trans-activação do Yap8

Dado que o módulo CDK8 tem um papel de regulador positivo na adaptação da levedura ao stress por arsénio e o Yap8 é o principal regulador envolvido na destoxificação deste composto, o passo seguinte foi verificar de que forma a deleção das subunidades deste módulo afecta a actividade do Yap8. Com o intuito então de determinar se a actividade de trans-activação do Yap8 sofria alguma alteração nos mutantes do módulo CDK8 as estirpes de *S. cerevisiae* SEY6210, *med12*, *med13*, *cycC* e *cdk8* foram co-transformadas com os plasmídeos codificando a fusão *lexA-YAP8* e o gene *reporter lacZ*. A actividade da enzima β -Galactosidase foi monitorizada como descrito na secção materiais e métodos.

Como ilustrado na figura 3.10, a actividade de trans-activação do factor de transcrição Yap8 é semelhante na estirpe selvagem e no mutante *med12*. No entanto, esta aumenta cerca de 50% e 100% nos mutantes *med13* e *cycC* respectivamente, e cerca de 600% no mutante *cdk8*, indicando que esta subunidade deve ser responsável pela regulação negativa da actividade de trans-activação deste factor de transcrição. Perante estes resultados pode sugerir-se que, embora o módulo CDK8 regule negativamente o Yap8, este módulo provavelmente desempenha um papel regulatório positivo na activação de outros genes que em conjunto são essenciais para a resposta da levedura ao stress induzido pelo arsénio, e por este motivo a sua eliminação leva ao comprometimento da sobrevivência das células a este stress. Estes resultados revelam que a actividade do módulo CDK8 é plástica, podendo comportar-se tanto como activador ou repressor de genes que contribuem para uma resposta celular comum.

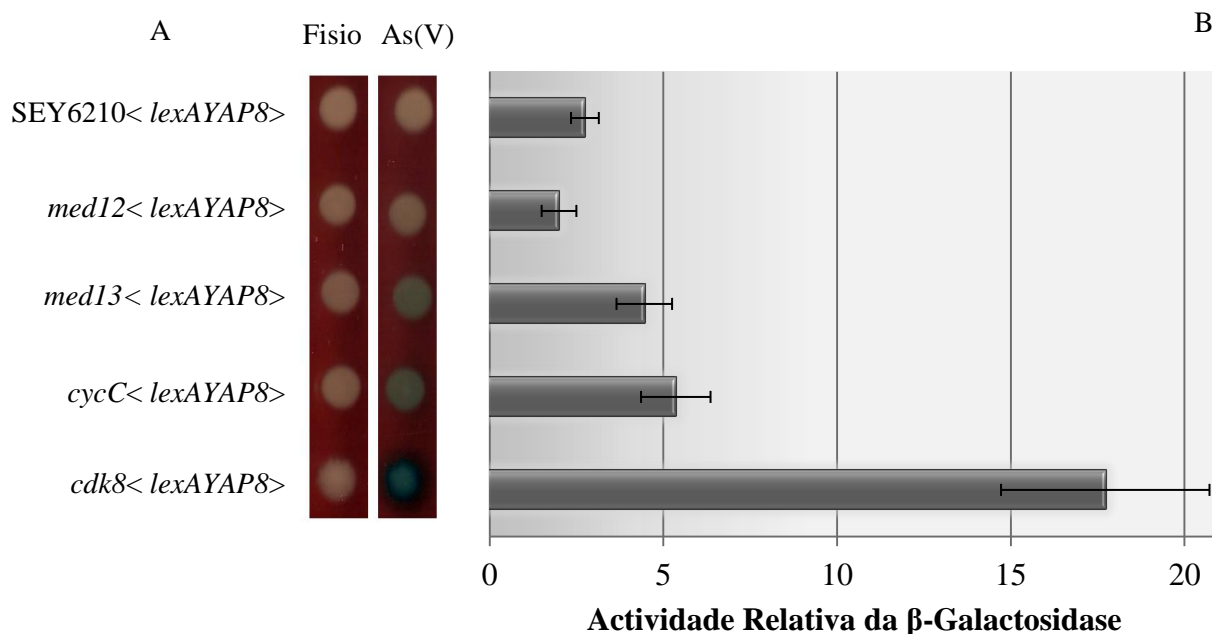


Figura 3.10: A) A perturbação das subunidades do módulo CDK8 do Mediador afecta a actividade de trans-activação do Yap8. A) estirpes selvagem e mutantes co-expressando *lexA-YAP8* e *lexAop-lacZ* foram incubadas em meio SD até atingir à fase de crescimento estacionária e $4,5 \times 10^7$ células foram plaqueadas em meio suplementado com 1mM de Na_2HAsO_4 (arsenato). A monitorização da actividade da β-Galactosidase foi efectuada como descrito na secção 2.5 dos materiais e métodos após 3h de incubação a 30°C. B) A análise quantitativa da actividade β-galactosidase foi realizada utilizando células em fase de crescimento exponencial induzidas por 1h com Na_2HAsO_4 (arsenato) como descrito na secção 2.6 dos materiais e métodos. Fisio – condições fisiológicas.

3.7 A cinase Cdk8 actua como repressor da actividade de trans-activação do Yap8 devido à destabilização dos níveis de Yap8 e Med2

As subunidades CycC e Cdk8 do módulo CDK8 podem influenciar negativamente as subunidades da cauda do Mediador, particularmente a Med2, (van de Peppel *et al*, 2005) e alguns factores de transcrição específicos (Bourbon, 2008). Uma vez que o Yap8 interage com o Med2, investigou-se o comportamento destas proteínas nos mutantes *cycC* e *cdk8* em condições fisiológicas e sob stress imposto pelos compostos de arsénio.

De forma a estabelecer o papel regulatório da cinase Cdk8 exercido sobre o Yap8 e o Med2, a estirpe selvagem SEY6210 e mutantes *cycC* e *cdk8* foram transformadas com as construções *YAP8-c-Myc* e *MED2-HA* codificadas pelos plasmídeos pRSYAP8 e pRSMED2 (tabela 2.3) e os níveis destas proteínas foram monitorizados por *Western-blotting*. Os resultados apresentados na figura 3.11 mostram um aumento dos níveis de Med2 na ausência da CycC e Cdk8 em condições fisiológicas, embora este aumento não seja tão evidente após a adição de arsenato. Estes resultados sugerem que o Cdk8 não só afecta o padrão de fosforilação do Med2 (van de Peppel *et al*, 2005) em condições fisiológicas, mas provavelmente também a sua estabilidade.

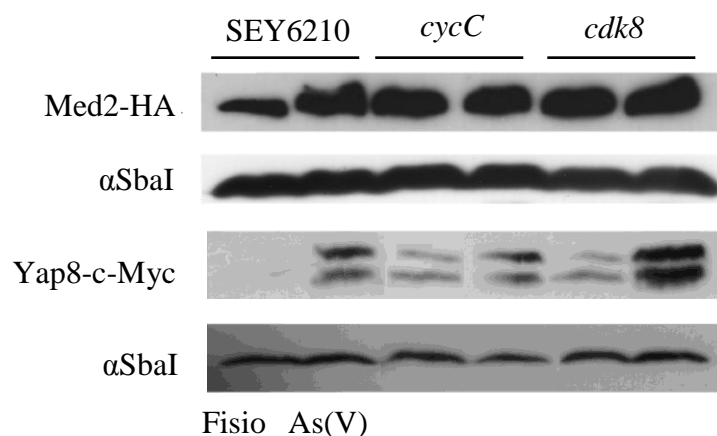


Figura 3.11: A cinase Cdk8 regula negativamente os níveis de Med2 e Yap8. Mutantes *cycC* e *cdk8* desregulam as quantidades de Yap8 e Med2. Estirpes selvagem e mutantes expressando a construção *YAP8-c-Myc* e *MED2-HA* em fase de crescimento exponencial foram induzidas durante 1h com 1 mM de Na_2HAsO_4 (arsenato) e os níveis de Yap8 e Med2 foram analisados por *Western-blotting* utilizando o anticorpo anti-c-Myc e anti-HA. A proteína αSbaI foi utilizada como controlo interno para normalização dos resultados. Fisio- Condições fisiológicas.

Os padrões de indução da Med2 são semelhantes nos mutantes *cycC* e *cdk8* sugerindo que não deve haver redundância quanto à ciclina que activa a Cdk8 nestas condições. Também os níveis de Yap8 parecem ser negativamente controlados pela Cdk8, uma vez que foi observado um aumento dos níveis de Yap8 na ausência deste factor, principalmente na presença de arsenato. Neste caso a ausência da CycC parece não ter um efeito significativo nos níveis do Yap8, sugerindo que a Cdk8 possa exercer o seu efeito regulatório negativo sobre o Yap8 após activação por outra ciclina. O facto de o Yap8 estar presente em maiores quantidades no mutante *cdk8* poderá provavelmente justificar a causa do aumento da sua trans-activação observada neste mutante. Este efeito parece ser exercido sobre o Yap8 e não ao nível da sua transcrição, uma vez que os resultados apresentados na secção 3.2 mostram que o Mediador não interfere com a transcrição constitutiva do *YAP8*, e as construções utilizadas nos ensaios de trans-activação são reguladas por um promotor constitutivo.

O facto de o Yap8 aparecer representado sob a forma de duas bandas pode indicar que esta proteína é um alvo putativo de modificações pós-traducionais. Resultados preliminares de análises *in silico* mostram que existem resíduos de aminoácidos na sua sequência que poderão ser potencialmente alvos de modificação por SUMOilação, ubiquitinação ou fosforilação.

4. Conclusões e Considerações Finais

O complexo Mediador é um importante co-activador na activação transcricional regulada por factores de transcrição específicos. O activador Gcn4 foi o primeiro membro dos factores de transcrição do tipo AP-1 em *Saccharomyces cerevisiae* a ter desvendado o mecanismo de activação transcricional dos seus genes alvo. Em resposta ao stress induzido pela depleção de fontes de nitrogénio, o Gcn4 é activado e interage com as subunidades Med5 e Med16 do módulo da cauda do complexo Mediador, desta forma facilitando o recrutamento da maquinaria basal de transcrição para a região promotora dos seus genes alvo (Chi *et al*, 2001). O domínio regulatório Cdk8 executa um efeito regulador negativo sobre o Gcn4 através da sua fosforilação, que é um sinal para ubiquitinação e degradação pelo proteasoma (Herbig *et al*, 2010).

Neste trabalho foram obtidas evidências quanto ao mecanismo utilizado pelo Yap8 para activar a transcrição do gene *ACR2* após a exposição das células aos compostos de arsénio. Foi demonstrado que o complexo Mediador participa na resposta adaptativa da levedura ao stress induzido pelos compostos de arsénio, dado que os mutantes onde as subunidades da cauda do Mediador foram eliminadas apresentam: (1) baixa tolerância ao arsénio; (2) a inibição parcial da expressão de *ACR2* em arsenato; e (3) o comprometimento da actividade de trans-activação do Yap8 na presença deste metalóide (figuras 3.1, 3.2 e 3.4). Através de ensaios de interacção *in vivo* e co-imunoprecipitação provou-se que o Yap8 e a subunidade Med2 do Mediador são capazes de estabelecer interacções físicas (figuras 3.6 e 3.8), tendo sido assim estabelecida uma relação funcional entre o factor de transcrição específico da resposta ao stress induzido pelo arsénio, o Yap8, e o co-activador geral de transcrição, o complexo Mediador. Foi também demonstrado que, embora a ausência das subunidades do domínio regulatório CDK8 comprometam a adaptação celular ao stress imposto pelo arsénio (figura 3.9), a actividade de trans-activação do Yap8 está aumentada nos mutantes para as subunidades Med13, CycC e Cdk8 (figura 3.10) possivelmente devido à desregulação dos níveis tanto de Yap8 como da subunidade Med2 do Mediador (figura 3.11). Uma vez que o Gcn4 interage com o Mediador através das subunidades Med15 e Med16 e o Yap8 com a subunidade Med2 pode-se concluir que os diferentes factores de transcrição AP1 da levedura transmitem sinais de indução específicos interagindo com diferentes subunidades da cauda do complexo Mediador.

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho permitem propor um modelo onde a actividade do Yap8 é regulada não só pela acumulação nuclear mas também pela cinase Cdk8 em dois níveis. Em condições fisiológicas a Cdk8 modifica, directa ou indirectamente o Yap8 e o Med2, destabilizando estas proteínas e impedindo assim a activação do *ACR2*. Em condições de stress induzido pelo arsénio, ambas as proteínas parecem evadir a regulação negativa pela Cdk8. Em consequência observa-se o aumento da concentração de Yap8 e Med2, o que facilita a interacção entre o Yap8 e o complexo Mediador, potenciando o aumento da transcrição do gene *ACR2*. Pode especular-se que quando a

concentração intracelular de arsénio diminui, a cinase Cdk8 volta a exercer o seu efeito repressor sobre o Yap8 e o Med2, levando à diminuição dos seus níveis de proteína (figura 4.1).

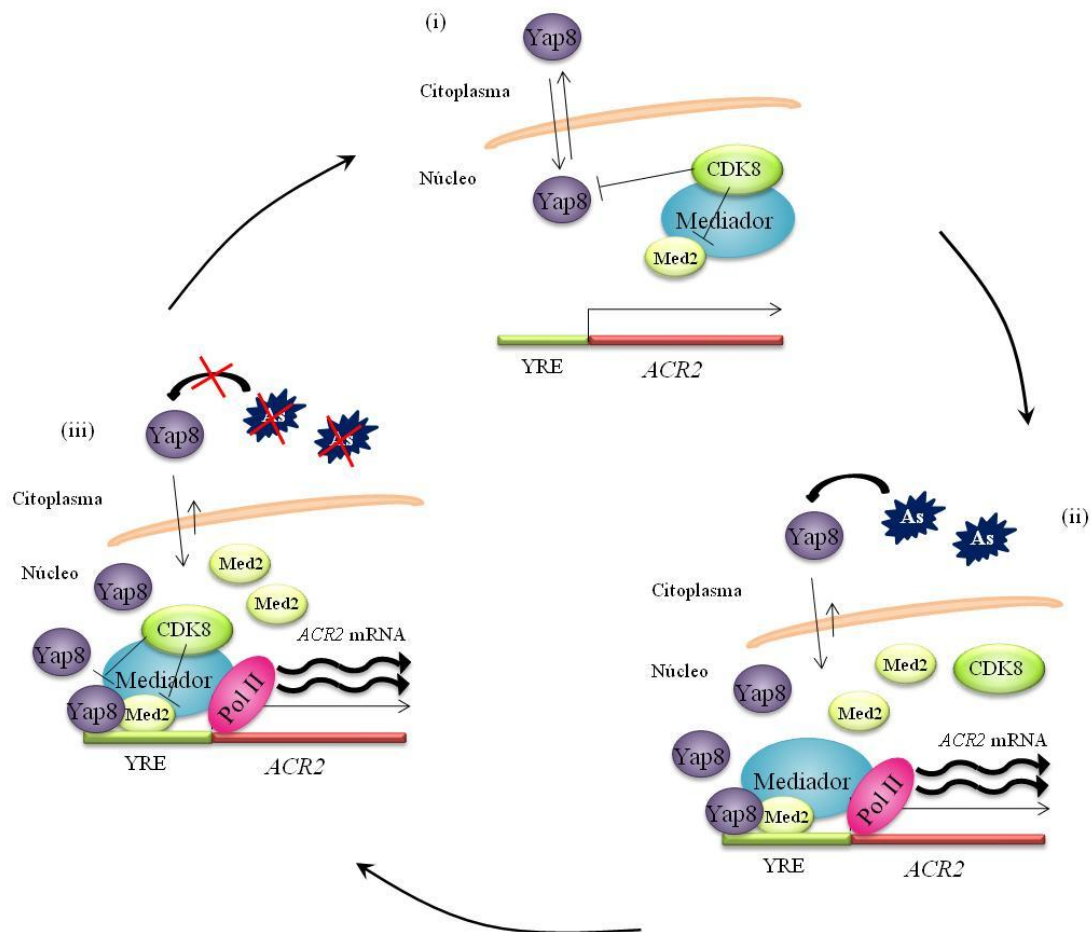


Figura 4.1: Modelo de interação do Yap8 com o Mediador e sua regulação.

De forma a caracterizar os eventos que medeiam a activação do gene *ACR2* pelo Yap8 e estabelecer uma ordem cronológica de recrutamento da RNA Pol II, Yap8, Mediador e factores remodeladores da cromatina à região promotora do *ACR2*, pretende-se futuramente executar ensaios de imunoprecipitação da cromatina. Para isso utilizar-se-ão as estirpes selvagens e mutantes *med14*, *cdk8*, *yap8*, *gcn5*, *spt3*, *spt20*, *snf2* e *snf5*. Por fim também irá explorar-se quais as modificações pós-traducionais que regulam a actividade do Yap8 e de que forma estas afectam a sua estabilidade.

5. Referências Bibliográficas

- Adams, P.D. e Ohh, M. 2005. Identification of associated proteins by coimmunoprecipitation. *Nature Methods* 2(6): 475-476.
- Akoulitchev, S., Chuikov, S. e Reinberg, D. 2000. TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* 407: 102-106.
- Altmann, K., Dürr, M. e Westernmann, B. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism to study mitochondrial biology. In *Mitochondria, Practical Protocols* (D. Leister e J.M. Herrmann eds), 1ª ed, pp 81-83, Springer, Berlin.
- Andrau, J., van de Pasch, L., Lijnzaad, P., Bijma, T., Koerkamp, M.G., van de Peppel, J., Werner, M. e Holstege, F.C.P. 2006. Genome-wide location of the coactivator mediator: binding without activation and transient Cdk8 interaction with DNA. *Molecular Cell* 22: 179-192.
- Barrett, M.P., Burchmore, R.J.S., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo, J.J. e Krishna, Sanjeev. 2003. The trypanosomiasis. *The Lancet* 362(9394): 1469-1480.
- Belakavadi, M. e Fondell, J.D. 2010. Cyclin-dependent kinase 8 positively cooperates with mediator to promote thyroid hormone receptor-dependent transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology* 30(10): 2437-2448.
- Béve, J., Hu, G., Myers, L.C., Balciunas, D., Werngren, O., Hultenby, K., Wilbom, R., Ronne, H. e Gustafsson, C.M. 2005. The structural and functional role of Med5 in the yeast mediator tail module. *The Journal of Biological Chemistry* 280(50): 41366-41372.
- Bhattacharjee, H. e Rosen, B.P. 2007. Arsenic metabolism in prokaryotic and eukaryotic microbes. In *Molecular Microbiology of Heavy Metals* (D.H. Nies e S. Silvers eds), 1ª ed., pp 371-398, Springer, Berlin.
- Biddick, R. e Young, E.T. 2005. Yeast mediator and its role in transcription regulation. *Comptes Rendus Biologies* 328(9): 773-782.
- Bjorklund, S. e Gustafsson, C.M. 2005. The yeast mediator complex and its regulation. *TRENDS in Biochemical Sciences* 30(5): 240-244.
- Bourbon, H. 2008. Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex. *Nucleic Acids Research* 36(12): 3993-4008.

- Boube, M., Joulia, L., Cribbs, D.L. e Bourbon, H. 2002. Evidence for a mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man. *Cell* 110: 143-151.
- Bun-ya, M., Shikata, K., Nakade, S., Yompakdee, C., Harashima, S. e Oshima, Y. 1997. Two new genes, PHO86 and PHO87, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 29(4): 344-351.
- Cai, G., Imasaki, T., Takagi, Y. e Asturias, F.J. 2009. Mediator structural conservation and implications for the regulation mechanism. *Structure* 17(4): 559-567.
- Casamassimi, A. e Napoli, C. 2007. Mediator complexes and eukaryotic transcription regulation: an overview. *Biochimie* 89: 1439-446.
- Chadick, J.Z. e Asturias, F.J. 2005. Structure of eukaryotic mediator complexes. *TRENDS in Biochemical Sciences* 30(5): 264-271.
- Chi, Y., Huddleston, M.J., Zhang, X., Young, R.A., Annan, R.S., Carr, S.A. e Deshaies, R.J. 2001. Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. *Genes & Development* 15: 1078-1092.
- Conaway, J.W., Florens, L., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T.J., Yao, T., Swanson, S.K., Banks, C.A.S., Washburn, M.P. e Conaway, R.C. 2005. The mammalian mediator complex. *FEBS Letters* 579: 904-908.
- Conaway, R.C., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Yao, T. e Conaway, J.W. 2005. The mammalian mediator complex and its role in transcriptional regulation. *TRENDS in Biochemical Sciences* 30(5): 251-254.
- Davis, J.A., Takagi, Y., Kornberg, R.D. e Asturias, F.J. 2002. Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: mediator conformation and polymerase interaction. *Molecular Cell* 10: 409-415.
- Degrandi, T.H., de Oliveira, I.M., d'Almeida, G.S., Garcia, C.R.L., Villela, I.V., Guecheva, T.N., Rosa, R.M. e Henriques, J.A.P. 2010. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis* 25(3): 257-269.
- Dickman, M. 2007. Redox regulation of physiological processes. *In* Redox Biochemistry (D. Becker, M. Dickman, V. Gladyshev e S. Ragsdale eds), 2ªed, Wiley, USA.
- Dujon, B., Alexandraki, D., André, B., Ansorge, W., Baladron, V., Ballesta, J.P.G., Banrevi, A., Bolle, P.A., Bolotin-Fukuhara, M., Bossier, P., Bou, G., Boyer, J., Buitrago, M.J., Cherét, G.,

Colleaux, L., Dalgan-Fornier, B., del Rey, F., Dion, C., Domdey, H., Düsterhöft, A., Düsterhus, S., Entian, K., Erfle, H., Esteban, P.F., Feldmann, H., Fernandes, L., Fobo, G.M., Fritz, C., Fukuhara, H., Gabel, C., Gaillon, L., Carcia-Cantalejo, J.M., Garcia-Ramirez, J.J., Gent, M.E., Ghazvini, M., Goffeau, A., González, A., Grothues, D., Guerreiro, P., Hegemann, J., Hewitt, N., Hilger, F., Hollenberg, C.P., Horaitis, O., Indge, K.J., Jacquier, A., James, C.M., Jauniaux, J.C., Jimenez, A., Keuchel, H., Kirchrath, L., Kleine, K., Kötter, P., Legrain, P., Liebl, S., Louis, E.J., Maia e Silva, A., Marck, C., Monnier, A., Möstl, D., Müller S., Obermaier, B., Oliver, S.G., Pallier, C., Pascolo, S., Pfeiffer, F., Philippsen, P., Planta, R.J., Pohl, F.M., Pohl, T.M., Pöhlmann, R., Portetelle, D., Purnelle, B., Puzos, V., Ramezani Rad, M., Rasmussen, S.W., Remacha, M., Revuelta, J.L., Richard, G., Rieger, M., Rodrigues-Pousada, C., Rose, M., Rupp, T., Santos, M.A., Schwager, C., Sensen, C., Skala, J., Soares, H., Sor, F., Stegemann, J., Tettelin, H., Thierry, A., Tzermia, M., Urrestarazu, L.A., van Dyck, L., van Vliet-Reedijk, J.C., Valens, M., Vandenbo, M., Vilela, C., Vissers, S., von Wettstein, D., Voss, H., Wiemann, S., Xu, G., Zimmermann, J., Haasemann, M., Becker I. e Mewes, H.W. 1994. Complete DNA sequence of yeast chromosome XI. *Nature* 369: 371-378.

Elmund, H., Baraznenok, V., Lindahl, M., Samuelson, C.O., Koeck, P.J.B., Holmberg, S., Hebert, H. e Gustafsson, C.M. 2006. The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(43): 15788-15793.

Environmental protection agency (EPA). Arsenic compounds. Version 6 November 2007. <http://www.epa.gov/ttnatw01/hlthef/arsenic.html>

Evens, A.M., Tallman, M.S. e Gartenhaus, R.B. 2004. The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present, and future. *Leukemia Research* 28: 891-900.

Fan, X., Chou, D.M., e Struhl, K. 2006. Activator-specific recruitment of mediator *in vivo*. *Nature Structural and Molecular Biology* 13: 96-97.

Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C. e Struhl, K. 1997. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Molecular and Cellular Biology* 17(12): 6982-6993.

Firestein R., Bass, A.J., Kim, S.Y., Dunn, I.F., Silver, S.J., Guney, I., Freed, E., Ligon, A.H., Vena, N., Ogino, S., Chheda, M.G., Tamayo, P., Finn, S., Shrestha, Y., Boehm, J.S., Jain, S., Bojarski, E., Mermel, C., Barretina, J., Chan, J.A., Baselga, J., Tabernero, J., Root, D.E., Fuchs, C.S., Loda, M., Shivdasani, R.A., Meyerson, M. e Hahn, W.C. 2008. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates β -catenin activity. *Nature* 455(7212): 547-551.

Frassinetti, S., Pitzalis, E., Marscherpa, M.C., Caltavuturo, L. e Morelli, E. 2011. A multidisciplinary approach for assessing the toxicity of marine sediments: analysis of metal content and elutriate bioassays using metal bioavailability and genotoxicity biomarkers. Archives of environmental contamination and toxicology (Epub ahead of print).

Ghavamzadeh, A., Alimoghaddam, K., Ghaffari, S.H., Rostami, S., Jahani M., Hosseini, R., Mossavi, A., Baybordi, E., Khodabadeh, A., Iravani, M., Bahar, B., Mortazavi, Y., Totonchi, M. e Aghdami, N. 2006. Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide without ATRA and/or chemotherapy. Annals of Oncology 17: 131-134.

Ghillebert, R., Swinnen, E., de Snijder, P., Smets, B. e Winderickx, J. 2011. Differential roles for the low-affinity phosphate transporters Pho87 and Pho90 in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical Journal 434: 243-251.

Gluglielmi, B., Van Berkum, N.L., Klapholz, B., Bijma, T., Boube, M., Boschiero, C., Bourbon, H., Holstege, F.C.P. e Werner, M. 2004. Nucleic Acids Research 32(18): 5379-5391.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. e Oliver, S.G. 1996. Life with 6000 genes. Science 274(2587): 563-567.

Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. e Brent, R. 1993. Cdi, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with cdk2. Cell 75(4): 791-803.

Herbig, E., Warfield, L., Fish, L., Fishburn, J., Knutson, B.A., Moorefield, B., Pacheco, D. e Hahn, S. 2010. Mechanism of mediator recruitment by tandem repeat Gcn4 activation domains and three Gal11 activator-binding domains. Molecular and Cellular Biology 30(10): 2376-2390.

Hightower, L.E. 1990. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. Cell 66(2): 191-197.

Holstege, F.C.P., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S. e Young, R.A. 1998. Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. Cell 95(5): 717-728.

Ilina, Y., Sloma, E., Maciasczyk-Dziubinska, E., Novotny, M., Thorsen, M., Wysocki, R. e Tamás, M. 2008. Characterization of the DNA-binding motif of the arsenic-responsive transcription factor Yap8p. Biochemical Journal 415: 467-475.

Järup, L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. British Medical Bulletin 68: 167-182.

- Kelleher, R.J., Flanagan, P.M. e Kornberg, R.D. 1990. A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* 61(7): 1209- 1215.
- Kitchin, K.T. e Ahmad, S. 2003. Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. *Toxicology Letters* 137:3-13.
- Knuesel, M.T., Meyer, K.D., Bernecky, C. e Taatjes, D.J. 2008. The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls mediator coactivator function. *Genes & Development* 23: 439-451.
- Kornberg, R.D. 2006. The molecular basis of eukaryotic transcription. *Cell Death and Differentiation* 14: 1989-1997.
- Kornberg, R.D. 2005. Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *TRENDS in Biochemical Sciences* 30(5): 235-239.
- Leroy, C., Cormier, L. e Kuras, L. 2006. Independent recruitment of mediator and SAGA by the activator Met4. *Molecular and Cellular Biology* 26(8): 3149-3163.
- Lewis, B.A. e Reinberg, D. 2003. The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. *Journal of Cell Science* 116: 3667-3675.
- Liu, Y., Kung, C., Fishburn, J., Ansari, A.Z., Shokat, K.M. e Hahn S. 2004. Two cyclin-dependent kinases promote RNA polymerase II transcription and formation of the scaffold complex. *Molecular and Cellular Biology* 24(4): 1721-1735.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., e Darnell, J. 2000. Protein structure and function. *In* Molecular Cell Biology (H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore e J. Darnell), 4^aed, pp 66-67, WH Freeman and company, USA.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., e Darnell, J. 2000. Transcriptional control of gene expression. *In* Molecular Cell Biology (H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore e J. Darnell), 4^aed, pp 448-468, WH Freeman and company, USA.
- Louis, E. 2011. *Saccharomyces cerevisiae*: Gene annotation and genome variability, state of the art through comparative genomes. *Methods in Molecular Biology* 759(2): 31-40.
- Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. e Estruch, F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response elements (STRE). *The EMBO Journal* 15(9): 2227-2235.

- Menezes, R.A., Amaral, C., Batista-Nascimento, L., Santos, C., Ferreira, R.V., Devaux, F., Eleutherio, E.C.A., e Rodrigues-Pousada, C. 2008. Contribution of Yap1 towards *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to arsenic-mediated oxidative stress. *Biochemical Journal* 414: 301-311.
- Menezes, R.A., Amaral, C., Delaunay, A., Toledano, M. e Rodrigues-Pousada, C. 2004. Yap8p activation in *Saccharomyces cerevisiae* under arsenic conditions. *FEBS Letters* 566: 141-146.
- Momeny, M., Zakidizaji, M., Chasemi, R., Dehpour, A.R., Rahimi-Balaei, M., Abdolazimi, Y., Ghavamzadeh, A., Alimoghaddam, K. e Ghaffari, S.H. 2010. *Medical Oncology* 27: 833-842.
- Murray, H.W. 2004. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71(6): 787-794.
- North, M., Tandon, V.J., Thomas, R., Loguinov, A., Gerlovina, I., Hubbard, A.E., Zhang, L., Smith, M. e Vulpe, C.D. 2011. Genome-wide functional profiling reveals genes required for tolerance to benzene metabolites in yeast. *Plos One* 6(8): 1-19.
- Outeiro, T.F. e Lindquist, S. 2003. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science* 302(5651): 1772-1775.
- Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos. 2009. Relatório anual do sector de águas e resíduos em Portugal, Volume 4- Controlo da qualidade da água para consumo humano. Versão de Setembro de 2010. <http://www.ersar.pt/website/ViewContent.aspx?FolderPath=%5cRoot%5cContents%5cSitio%5cMenuPrincipal%5cDocumentacao&SubFolderPath=%5cRoot%5cContents%5cSitio%5cMenuPrincipal%5cDocumentacao%5cPublicacoesIRAR&BookCategoryID=1&BookTypeID=3&Section=MenuPrincipal>.
- Rodrigues-Pousada, C., Menezes, R.A. e Pimentel, C. 2010. The Yap family and its role in stress response. *Yeast* 27: 245-258.
- Rosen, B.P. 2002. Transport e detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comparative Biochemistry and Physiology part A* 133: 689-693.
- Shahi, P., Gulshan, K., Näär, A.M. e Moye-Rowley, S. 2010. Differential roles of transcriptional mediator subunits in regulation of multidrug resistance gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 21: 2469-2482.
- Sherman, F. 2002. Getting started with yeast. *Methods in Enzymology* 350: 3-41.

- Sogaard, T.M.M. e Svejstrup, J.Q. 2007. Hyperphosphorylation of the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II facilitates dissociation of its complex with mediator. *The Journal of Biological Chemistry* 282(19): 14113-14120.
- Soutourina, J., Wydau, S., Ambroise, Y., Boschiero, C. e Werner, M. 2011. Direct interaction of RNA polymerase II and mediator required for transcription *in vivo*. *Science* 331: 1451-1454.
- Thorsen, M., Di, Y., Tängemo, C., Morillas, M., Ahmadpour, D., Van der Does, C., Wagner, A., Johansson, E., Boman, J., Posas, F., Wysocki, R. e Tamás, M.J. 2006. The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Molecular Biology of the Cell* 17: 4400-4410.
- Thompson, C.M. e Young, R.A. 1995. General requirement for RNA polymerase II holoenzymes *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 92(10): 4587-4590.
- Toledano, M.B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D. and Azevedo, D. 2003. Oxidative stress response in yeast. *In Yeast Stress Responses* (S. Hohmann and W.H. Mager eds), 1^aed, Springer, Berlin.
- Vahter, M. 2009. Effects of arsenic on maternal and fetal health. *Annual Review of Nutrition*. 29: 381-399
- van de Peppel, J., Kettelarij, N., van Bakel, H., Kockelkorn, T.T.J.P., van Leenen, D. e Holstege F.C.P. 2005. Mediator expression profiling epistasis reveals a signal transduction pathway with antagonistic submodules and highly specific downstream targets. *Molecular Cell* 19: 511-522.
- Vincent, O., Kuchin, S., Hong, S., Townley, R., Vyas, V.K. e Carlson, M. 2001. Interaction of the Srb10 kinase with Sip4, a translational activator of gluconeogenic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 21(17): 5790-5796.
- Waxman, S., e Anderson, K.C. 2001. History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy. *The Oncologist* 6(2):3-10.
- Yujun, D. e Tamás, M.J. 2006. Regulation of the arsenic-responsive transcription factor Yap8p involves the ubiquitin-proteasome pathway. *Journal of Cell Science* 120: 256-264.
- Zhou, X., Arita, A., Ellen, T.P., Liu, X., Bai, J., Rooney, J.P., Kurtz, A.D., Catherine, B.K., Dai, W., Begley T.J. e Costa, M. 2009. A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals pathways affected by arsenic toxicity. *Genomics* 94(5): 294-307.